



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS

ISABEL PORTELA RABELLO

ESTUDO DE LIGAS DE NITINOL RECOBERTAS COM BIOCERÂMICA PARA
APLICAÇÃO ODONTOLÓGICA

CAMPINA GRANDE - PB
AGOSTO / 2012

ISABEL PORTELA RABELLO

**ESTUDO DE LIGAS DE NITINOL RECOBERTAS COM BIOCERÂMICA PARA
APLICAÇÃO ODONTOLÓGICA**

**Trabalho de Dissertação apresentado
ao Departamento de Ciência e
Engenharia de Materiais da
Universidade Federal de Campina
Grande como exigência final para
obtenção do título de Mestre em
Ciência e Engenharia de Materiais.**

Orientador: PROF. DR. MARCUS VINICIUS LIA FOOK

CAMPINA GRANDE - PB

AGOSTO / 2012



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCCG

R114c Rabello, Isabel Portela.
Estudo de ligas de nitinol recobertas com biocerâmica para aplicação
odontológica / Isabel Portela Rabello. - Campina Grande, 2012.
110f.: il., color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook.
Referências.

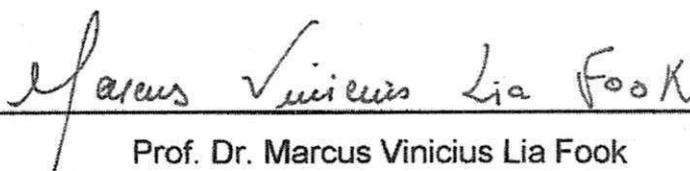
1. Propriedades de Materiais. 2. Nitinol. 3. Método Biomimético. 4.
Laser. 5. Citotoxicidade. 6. Bioatividade. I. Título.

CDU 620.17 (043)

**ESTUDO DE LIGAS DE NITINOL RECOBERTAS COM BIOCERÂMICA PARA
APLICAÇÃO ODONTOLÓGICA**

ISABEL PORTELA RABELLO

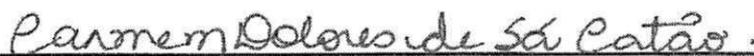
Dissertação aprovada em 10 de agosto de 2012 por banca constituída pelos seguintes membros:



Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador / UFCG)



Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa
(Examinador Interno / UFCG)



Prof. Dr^a. Carmem Dolores de Sá Catão
(Examinadora Externa / UFCG)

CAMPINA GRANDE
AGOSTO / 2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e a Thiago, os amores da minha vida. Tudo isso só tem valor porque eu tenho todos vocês para dividir a alegria desse momento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para estudar e suportar o cansaço de cada madrugada mal dormida, por me conduzir em desafios que eu não sabia que era capaz de vencer.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, por me ensinar que não existem impossibilidades para quem quer vencer na vida. Obrigada, Professor, não só pela orientação, mas pelos ensinamentos, pelo carinho, pelas oportunidades proporcionadas.

Aos meus pais, Gildo e Ana. Ser filha de vocês é motivo de muito orgulho. Obrigada pela confiança que depositam em mim, pelo apoio, pelo amor que sinto em cada atitude.

A Thiago, que me ensinou a sonhar. Planejar o futuro com um homem de tantas qualidades é um grande privilégio. Obrigada pela compreensão, pelo carinho, pela preocupação e, principalmente, pelo amor.

Aos meus irmãos, Germana e Guilherme, meus espelhos profissionais. Obrigada por acompanharem cada passo meu e por torcerem sempre por mim. Quero um dia ser tão competente quanto vocês.

Aos meus cunhados Rachel e Reinaldo, irmãos que ganhei. Obrigada por sempre se fazerem presentes na minha vida, pelas conversas, brincadeiras e apoio em tudo que faço.

A Eduardo, que chegou e nos mostrou que nós não éramos completos sem ele.

A Marlene, minha segunda mãe, por torcer por mim e estar presente em todas as etapas de minha vida.

Aos meus avós, tios e primos pelo convívio e alegrias proporcionadas.

A todos os companheiros do CERTBIO pela amizade e tantos momentos bons compartilhados. Em especial a Greyce, Carmem, Carol, Glória, Ítalo, Rosseberg, Thiago, Paulo, Waldênia, Emilly, Klaidson e Emanuel. Agradeço também a Adriana, João Paulo, Anna Sylvia, Hugo, Eva, Daniel, Maria Eduarda, Lidiane, Amanda, Valéria, Magna, Roberta, Jeferson, Rafaella, Rita, Rodrigo, Márcio, Wladymyr e Katylaine. Agradeço também aos funcionários e técnicos Adriana, Geanne, S.Sérgio, Márcia, Germano e Alessandra.

A Prof. Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos e Marisa Polesi, pela dedicação e hospitalidade durante os quatro meses de aprendizado, e também a toda equipe do Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas da UNESP campus Araraquara, em especial a Thaís, Djamile, Pâmela, Livia e Daniele. Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi, por ceder o laboratório para a confecção das amostras deste estudo. Agradeço a todos do Laboratório de Biomateriais do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, em especial a Anahi, Diego, Nilson e Vinicius.

Aos meus amigos de longa data luzianny, Sanderson e Kiarelli, pelo apoio e por acreditarem em mim.

Aos amigos Erica e Alan, conquistados durante o curso de Odontologia, pelo incentivo e companheirismo.

À Prof. Dr^a. Carmem Dolores de Sá Catão, Prof. Dr^a. Roberta Oliveira Pinto e Dr. Rosemberg Cardoso Barbosa pela disponibilidade e contribuições de grande valor para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao corpo docente e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais pelos conhecimentos transferidos e apoio para que todas as etapas fossem cumpridas.

À Capes, pelo essencial apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desta etapa.

Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

Pode ser considerado como biomaterial todo dispositivo, na perspectiva da interação com o meio biológico, de variada temporalidade, de origem natural ou sintética, que tem o propósito de induzir uma atividade biológica específica, através do tratamento, aumento ou substituição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo. O desenvolvimento da Implantodontia tem dado incentivo à pesquisa de biomateriais para esse fim, bem como das reações que ocorrem na interface tecido-implante. Os implantes atualmente utilizados são compostos basicamente por Titânio, embora esse material não atenda a todos os requisitos necessários para sua utilização para esse fim. Na tentativa de sanar as necessidades através do desenvolvimento de um biomaterial que atenda de forma mais satisfatória os requisitos exigidos, esta pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento e a avaliação de ligas de Nitinol em diferentes composições, submetidas à aplicação de laser e deposição de apatitas pelo Método Biomimético, para aplicação odontológica. Foram desenvolvidas três composições, sendo uma equiatômica, uma rica em níquel e outra rica em titânio. As três composições foram avaliadas através de quatro circunstâncias distintas: polidas, irradiadas a laser, modificadas por laser e com deposição de apatitas por Solução Biomimética tipo 0 e modificada por laser e com deposição de apatitas por Solução Biomimética tipo 6. As caracterizações foram realizadas através dos ensaios de citotoxicidade, molhabilidade, microscopia óptica e bioatividade. As modificações superficiais tornaram possível a utilização das três composições que, apenas polidas, foram inviáveis ao uso em seres vivos, apresentando viabilidade celular inferior a 50%, promovendo também propriedades físico-químicas e biológicas mais favoráveis à utilização proposta. A liga que apresentou propriedades mais adequadas foi a rica em titânio com aplicação de laser e deposição de apatitas através de SBF tipo 6. Diante disso, as ligas com modificações superficiais mostraram-se mais apropriadas à osseointegração, em virtude de possuírem maior rugosidade e área de contato, além da presença de apatitas, que tendem a promover mais rápida adesão do biomaterial ao tecido ósseo.

Palavras-chave: Nitinol; Método Biomimético; Laser; Citotoxicidade; Bioatividade.

ABSTRACT

May be considered biomaterial any device that interact with the biological environment, of varied temporality, natural or synthetic, that has the purpose to inducing a specific biological activity through the treatment, increase or replacement of any tissue, organ or function in the body. The development of dental implants has provided incentive for research in this purpose, as well as the reactions that occur in tissue-implant interface. The implants currently used are basically composed of titanium, although this material does not attend all the necessary requirements for its use for that purpose. This research aimed the development and evaluation of Nitinol alloys in different compositions, subject to the application of superficial laser and apatite deposition by Biomimetic Method. Three compositions were developed: one equiatomic, one rich in nickel and the other rich in titanium. The three compositions were evaluated through four distinct circumstances: polished, laser irradiated, modified by laser and apatite deposition for biomimetic solution type 0 and modified by laser and apatite deposition for biomimetic solution type 6. The characterizations were performed using the cytotoxicity assay, wettability, optical microscopy and bioactivity. The surface modifications made possible the utilization of three compositions, that just polished, were impractical for use in living beings, with cell viability below 50%, also promoting physico-chemical and biological characteristics more favorable for the proposed use. The alloy that had properties better suited was rich in titanium with laser application and apatite deposition through SBF type 6. Therefore, alloys with surface modifications were more appropriate for osseointegration, due to having greater roughness and contact area, besides the presence of apatite, which tend to promote more quick adhesion with biomaterial and bone.

Keywords: Nitinol; Biomimetic Method; Laser; Citotoxicity; Bioactivity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Fosfato de Cálcio Amorfo
CCC	Estrutura Cúbica de Corpo Centrado
CFC	Estrutura Cúbica de Face Centrada
CN	Controle Negativo
DRX	Difratometria de Raios X
EDX	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios X
EMF	Efeito Memória de Forma
HA	Hidroxiapatita
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LMF	Liga com Memória de Forma
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Óptica
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio
Ni	Níquel
NiTi	Liga de Níquel e Titânio (Nitinol)
Nitinol	<i>Nickel Titanium Naval Ordinance Laboratory</i>
NO	Óxido Nítrico
OCP	Fosfato Octacálcico
PBS	Solução salina tamponada de fosfatos
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i>
SMA (LMF)	<i>Shape Memory Alloy</i> (Liga com memória de forma)
TCP	Fosfato Tricálcico
Ti	Titânio
Ti cp	Titânio comercialmente puro
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura cristalina do Níquel	24
Figura 2: Estrutura cristalina do Titânio	24
Figura 3: Estrutura cristalina de liga de NiTi	24
Figura 4: Diagrama de fases do NiTi	26
Figura 5: Estrutura monoclinica do Nitinol na fase martensita.	27
Figura 6: Estrutura cristalina do Nitinol na fase austenita.	27
Figura 7: Ciclo de transformações de fases da liga de Nitinol.	28
Figura 8: Gráfico representativo da Histerese.	29
Figura 9: Representação esquemática da evolução estrutural da ativação da superfície do titânio obtida através de tratamento químico em solução de NaOH.	38
Figura 10: Possíveis reações histológicas na interface osso/implante para vários materiais para implante.	40
Figura 11: Substituição do dente ausente através de biomaterial metálico – implante odontológico.	40
Figura 12 - Esquema de classificação das amostras, segundo os tratamentos de superfícies realizados	41
Figura 13 - Bastão de Nitinol ao sair do forno de fusão	43
Figura 14 - Cilindro de Nitinol sendo seccionado por disco diamantado	44
Figura 15 - Pastilhas de Nitinol	44
Figura 16 - Polimento das pastilhas de Nitinol em lixa de óxido de alumínio	44
Figura 17 - Equipamento OmniTek	45
Figura 18 - Superfície da pastilha de Nitinol irradiada pelo Laser Ytterbium pulsado	45
Figura 19 - Amostras imersas em água destilada dentro da Lavadora Ultrassônica	46
Figura 20 - Ataque químico superficial utilizando-se hidróxido de sódio	46
Figura 21 - Amostras imersas em SBF, acondicionadas em estufa a 37°C	47
Figura 22: Forno da marca EDG Equipamentos, utilizado para o tratamento térmico das amostras	48

Figura 23: Camundongos machos da espécie Swiss	50
Figura 24: Estufa com controle de humidade e temperatura	50
Figura 25: Inoculação de tioglicolato de sódio a 3%	51
Figura 26: Injeção de solução salina tamponada de fosfatos em camundongo imobilizado	51
Figura 27: Microscópio óptico com câmara de Neubauer	52
Figura 28: Leitor de Elisa com placa de cultura de células	53
Figura 29: Equipamento utilizado para o ensaio de molhabilidade	55
Figura 30: Observação do ângulo de contato formado entre um sólido e um líquido	55
Figura 31: MEV modelo TM-1000 da marca Hitachi	57
Figura 32: Balança eletrônica de precisão da marca Ohaus Adventurer.	58
Figura 33 - Gráfico referente à viabilidade celular de macrófagos quando em contato com as diferentes ligas de Nitinol	59
Figura 34: Gráfico referente à produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss quando em contato com as diferentes ligas de Nitinol	62
Figura 35: Ensaio de molhabilidade da composição Equiatômica apenas com polimento (a); com aplicação superficial de laser Ytterbium pulsado (b) e com deposição de apatitas pelo Método Biomimético utilizando SBF tipo 0 (c) e tipo 6 (d).	65
Figura 36: Ensaio de molhabilidade da composição rica em titânio apenas com polimento (a); com aplicação superficial de laser Ytterbium pulsado (b) e com deposição de apatitas pelo Método Biomimético utilizando SBF tipo 0 (c) e tipo 6 (d).	66
Figura 37: Ensaio de molhabilidade da composição rica em níquel apenas com polimento (a); com aplicação superficial de laser Ytterbium pulsado (b) e com deposição de apatitas pelo Método Biomimético utilizando SBF tipo 0 (c) e tipo 6 (d).	67
Figura 38: Liga equiatômica polida (a), irradiada à laser (b), com deposição de SBF-0 (c) e SBF-6, analisada utilizando-se microscopia óptica.	69
Figura 39: Liga rica em níquel polida (a), irradiada à laser (b), com	70

deposição de SBF-0 (c) e SBF-6, analisada utilizando-se microscopia óptica.	
Figura 40: Liga rica em titânio polida (a), irradiada à laser (b), com deposição de SBF-0 (c) e SBF-6, analisada utilizando-se microscopia óptica.	70
Figura 41: Liga equiatômica polida analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.	72
Figura 42: Elementos químicos presentes nas amostras equiatômicas polidas analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.	73
Figura 43: Liga rica em níquel polida analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.	73
Figura 44: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em níquel polidas analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.	74
Figura 45: Liga rica em titânio polida analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.	74
Figura 46: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em titânio polidas analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.	75
Figura 47: Liga equiatômica modificada por laser analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.	76
Figura 48: Elementos químicos presentes nas amostras equiatômicas modificadas por laser analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.	76
Figura 49: Liga rica em níquel modificada por laser analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.	77
Figura 50: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em níquel modificadas por laser analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.	77
Figura 51: Liga rica em titânio modificada por laser analisada em MEV	78

com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

Figura 52: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em titânio modificadas por laser analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade. 78

Figura 53: Liga equiatômica modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0. 79

Figura 54: Elementos químicos presentes nas amostras equiatômicas modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade. 80

Figura 55: Liga equiatômica modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0. 80

Figura 56: Elementos químicos presentes nas amostras equiatômicas modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade. 81

Figura 57: Liga rica em níquel modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0. 81

Figura 58: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em níquel modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade. 82

Figura 59: Liga rica em níquel modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0. 82

Figura 60: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em níquel modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade. 83

Figura 61: Liga rica em titânio modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.	83
Figura 62: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em titânio modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.	84
Figura 63: Liga rica em titânio modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.	84
Figura 64: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em titânio modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.	85
Figura 65: Difratoograma de raios-X para a liga equiatômica polida antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.	86
Figura 66: Difratoograma de raios-X para a liga rica em níquel polida antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.	87
Figura 67: Difratoograma de raios-X para a liga rica em titânio polida antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.	87
Figura 68: Difratoograma de raios-X para a liga equiatômica com aplicação superficial de laser antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.	88
Figura 69: Difratoograma de raios-X para a liga rica em níquel com aplicação superficial de laser antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.	89
Figura 70: Difratoograma de raios-X para a liga rica em titânio com aplicação superficial de laser antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.	89
Figura 71: Difratoograma de raios-X para a liga equiatômica com	90

deposição de apatitas por SBF-6 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

Figura 72: Difratoograma de raios-X para a liga equiatômica com deposição de apatitas por SBF-0 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade. **91**

Figura 73: Difratoograma de raios-X para a liga rica em níquel com deposição de apatitas por SBF-6 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade. **91**

Figura 74: Difratoograma de raios-X para a liga rica em níquel com deposição de apatitas por SBF-0 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade. **92**

Figura 75: Difratoograma de raios-X para a liga rica em titânio com deposição de apatitas por SBF-6 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade. **92**

Figura 76: Difratoograma de raios-X para a liga rica em titânio com deposição de apatitas por SBF-0 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade. **93**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades do Nitinol comparadas às propriedades de outros compostos	30
Tabela 2 - Módulo de Elasticidade de alguns compostos comparados aos valores existentes em segmentos do dente e osso humanos	30
Tabela 3 - Parâmetros fixos utilizados na irradiação pelo Laser Ytterbium pulsado	45
Tabela 4 - Concentrações iônicas das soluções SBF utilizadas (mmol.dm ⁻³)	47
Tabela 5 - Denominações referentes ao gráfico de viabilidade e seus significados	59
Tabela 06: Médias e desvio-padrão dos valores de células viáveis em presença das ligas em suas variadas composições e modificações superficiais, e para os controles positivo e negativo.	61
Tabela 07 - Denominações referentes ao gráfico de produção de óxido nítrico e seus significados	62
Tabela 08: Médias e desvio-padrão dos valores de células viáveis em presença das ligas em suas variadas composições e modificações superficiais, e para os controles positivo e negativo.	63
Tabela 9: Ângulos de contato encontrados no ensaio de molhabilidade para os diferentes tratamentos superficiais da composição equiatômica.	65
Tabela 10: Ângulos de contato encontrados no ensaio de molhabilidade para os diferentes tratamentos superficiais da composição rica em titânio.	66
Tabela 11: Ângulos de contato encontrados no ensaio de molhabilidade para os diferentes tratamentos superficiais da composição rica em níquel.	67
Tabela 12: Média aritmética do ganho em peso de cada variável estudada.	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Biomateriais	24
3.1.1 Biomateriais de Uso Odontológico	26
3.2 Propriedades do Nitinol	29
3.2.1 Histerese térmica	33
3.2.2 Efeito Memória de Forma	34
3.1.3 Superelasticidade (Módulo de Elasticidade)	35
3.1.4 Biocompatibilidade das ligas de Nitinol	36
3.3 Modificação de Superfície	37
3.3.1 Utilização do Laser	40
3.3.2 Deposição de Apatitas pelo Método Biomimético	41
3.4 Osseointegração	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Materiais	46
4.2 Preparação das amostras	47
4.2.1 Obtenção das ligas de Nitinol	47
4.2.2 Obtenção das pastilhas de Nitinol	48
4.2.3 Modificação da superfície pelo Laser Ytterbium pulsado	49
4.2.4 Ataque alcalino	50
4.2.5 Deposição de apatitas sobre a superfície do Nitinol modificada por laser	51
4.2.6 Tratamento térmico	52
4.3 Caracterização das ligas de Nitinol	53
4.3.1 Ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT	54
4.3.1.3 Esterilização do biomaterial para o ensaio de citotoxicidade	55
4.3.1.2 Obtenção das células do exsudato peritoneal	55
4.3.1.3 Avaliação da viabilidade celular	57

4.3.1.4 Determinação da produção de Óxido Nítrico	58
4.3.1.5 Comitê de Ética em Pesquisa	59
4.3.1.6 Análise Estatística dos Dados	60
4.4 Tensão Superficial (Molhabilidade)	60
4.5 Microscopia Óptica	61
4.6 Ensaio de Bioatividade	61
4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	62
4.6.2 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)	62
4.6.3 Difração de Raios-X (DRX)	63
4.6.4 Pesagem das amostras	63
5 RESULTADOS	64
5.1 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos	64
5.1.1 Determinação da Produção de Óxido Nítrico	67
5.2 Avaliação da Molhabilidade	69
5.3 Microscopia Óptica	73
5.4 Bioatividade	76
5.4.1 Pesagem das amostras	76
5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)	77
5.4.3 Difração de Raios-X (DRX)	91
6 CONCLUSÕES	105
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da Odontologia é manter ou melhorar a qualidade de vida do paciente, e pode ser alcançado pela prevenção de doenças, pelo alívio da dor, aperfeiçoamento da eficiência mastigatória, aprimoramento da fonética e pela melhoria da aparência. Em virtude de muitos desses objetivos requererem a reposição ou alteração da estrutura dentária existente, há séculos, o principal desafio tem sido o desenvolvimento e a seleção de materiais biocompatíveis e duráveis. Acredita-se que a Odontologia como especialidade médica surgiu por volta de 3000 a.C. Contudo, as mais antigas evidências de próteses parciais, transplantes de dentes humanos e implantes datam de 700 a.C, utilizando marfim e ouro (PHILLIPS, 2007).

Por muito tempo, órgãos e tecidos danificados eram removidos com a ilusão de que isso traria benefícios para a qualidade de vida do paciente. O dano funcional e estético provocado pela perda não era, até então, percebido com tanta intensidade, em virtude da baixa expectativa de vida da população. Nos tempos atuais, com a melhoria da qualidade de vida, o avanço científico e a expectativa de que a população viva cada vez mais, torna-se essencial a busca por materiais com propriedades adequadas para a substituição do órgão ou tecido lesado, devolvendo vida normal ao paciente (APARECIDA, 2006).

Ao longo dos últimos séculos, uma grande variedade de materiais tem sido empregada na substituição de dentes naturais, incluindo osso, dentes de animais, dentes humanos, marfim, conchas marinhas, cerâmicas e metais. Diante disso, merece grande destaque o campo de biomateriais, que se desenvolveu historicamente de forma a se obter uma combinação satisfatória de propriedades próximas àquelas do tecido substituído, estimulando ou provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias (PHILLIPS, 2007; ORÉFICE *et al.*, 2006; SOARES, 2002).

Os Biomateriais podem ser considerados como produtos adequados para a utilização em seres humanos, com a finalidade de tratamento ou alívio de uma enfermidade ou lesão, e também para a substituição e modificação de sua anatomia ou de um processo fisiológico, podendo ser de origem natural ou sintética. Desta forma, pode-se considerar como biomateriais desde os materiais empregados em

implantes, independente de sua composição, até os materiais utilizados na fabricação de instrumentos médicos e cirúrgicos que entram em contato com o organismo. Os biomateriais podem ter origem metálica, polimérica e cerâmica, também podendo apresentar características obtidas da combinação destes, nos chamados compósitos (BIOMATERIALES, 2012).

O estudo dos biomateriais está fundamentalmente atrelado a dois conceitos básicos: funcionalidade e biocompatibilidade, sendo eles os pilares de sustentação no estudo e aplicação desse importante campo da ciência. Funcionalidade é o conjunto de propriedades inerentes ao material que o permite desempenhar uma função desejada, enquanto que biocompatibilidade é a aceitação do material pelo meio biológico que o aloja (PUCCI *et al.*, 2002).

O desenvolvimento da Implantodontia tem dado incentivo à pesquisa de biomateriais para esse fim, bem como das reações que ocorrem na interface tecido-implante. Uma das reações mais desejáveis entre o biomaterial e o tecido vivo que o aloja é a osseointegração, cujo resultado é a adesão físico-química entre o osso e a superfície do implante sujeito a cargas funcionais, propiciando melhor adaptação do biomaterial ao organismo e mais rápida recuperação de sua função (BRANEMARK, 1986; SILVA, 2012).

Segundo Steinemann (1994), os implantes atualmente utilizados são compostos basicamente por titânio, que apresenta como principais características a reatividade, a capacidade de ser inerte e as boas propriedades mecânicas. Embora essas características tenham uma importância singular em se tratando de um biomaterial, uma outra propriedade que ainda não foi atingida de forma satisfatória pelo titânio é o módulo de elasticidade, uma vez que essa propriedade nos implantes compostos unicamente por titânio apresenta-se superior ao meio biológico, que é o osso. Isso se traduz em concentração de tensões entre o implante e o osso que o aloja, de forma a significar um risco maior para a ocorrência de fraturas.

O Nitinol é uma liga de níquel (Ni) e titânio (Ti) que apresenta adequadas propriedades para utilização como implante dentário, a exemplo da biocompatibilidade e módulo de elasticidade próximo ao osso humano, por isto, sua aplicação tem sido enfatizada em vários dispositivos na área médica e na odontologia em geral. Outras características, como superelasticidade e efeito memória de forma (SMA – Shape Memory Alloy), ressaltam a significância desta

liga, devido ao fato de conferirem aos materiais a capacidade de auto-expansão e de não apresentar rejeição ao organismo (KRONE *et al.*, 2005).

Recentemente, tem sido explorada a otimização das propriedades de superfície dos implantes, como acabamento superficial, rugosidade e molhabilidade. Alterações na camada de óxido de metais como o titânio também têm sido bastante investigadas e, paralelamente, técnicas de recobrimento com materiais bioativos têm sido desenvolvidas. Dentre os materiais bioativos, a hidroxiapatita se destaca pela sua semelhança com os fosfatos de cálcio presentes na fase mineral do osso (SILVA, 2012).

Desta forma, a rugosidade obtida através de tratamento superficial à *laser* pode resultar em um filme microporoso aderente ao substrato, enquanto o recobrimento pelo Método Biomimético através de imersão em SBF (*Simulated Body Fluid*) pode implicar na formação de uma camada de fosfato de cálcio (apatita), tornando a superfície do biomaterial bioativa (GODLEY *et al.*, 2004).

Diante do atual nível de desenvolvimento científico relativo aos implantes dentários e da busca por biomateriais com propriedades mais adequadas para esse tipo de aplicação clínica, este trabalho visou avaliar a citotoxicidade e bioatividade de ligas de Nitinol com modificação superficial por *laser* e recobrimento por apatitas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e avaliar ligas de Nitinol em diferentes composições, submetidas à aplicação de laser e deposição de apatitas pelo Método Biomimético, para aplicação odontológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir as ligas de Nitinol em três composições distintas e modificá-las superficialmente através de polimento, aplicação de Laser e deposição de apatitas pelo Método Biomimético;
- Avaliar a citotoxicidade e a molhabilidade das amostras nas suas diversas condições superficiais;
- Investigar a microestrutura das composições das ligas com e sem as modificações superficiais;
- Analisar a influência das modificações superficiais quanto à bioatividade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Durante vários séculos, quando tecidos ou órgãos sofriam danos irreparáveis, a única alternativa era a remoção da porção afetada, com inquestionáveis limitações e danos ao organismo, tanto físicos quanto psicossociais. Esta remoção, que aparentemente contribuía para a melhoria da qualidade de vida do indivíduo, não tinha seus reais prejuízos percebidos com maior intensidade devido à baixa expectativa de vida da população. Os avanços científicos alcançados, aliados ao aumento da expectativa de vida da população, tornou possível e indispensável a substituição do órgão ou tecido perdido, capacitando-o a exercer suas atividades diárias com o mínimo de limitações e desconfortos (APARECIDA, 2006; SILVA, 2012).

Biomaterial é todo dispositivo, na perspectiva da interação com o meio biológico, de variada temporalidade, de origem natural ou sintética, que tem o propósito de induzir uma atividade biológica específica, através do tratamento, aumento ou substituição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo (SILVA, 2012; GUELCHER; HOLLINGER, 2005; BASU; NATH, 2009).

Nesses termos, o estudo e desenvolvimento de biomateriais toma grande destaque por ser a medida de substituição da parte perdida que possui maior confiabilidade, pelo fato de as características desejadas serem asseguradas por adequadas práticas de fabricação, normas internacionais e testes de qualidade, o que garante também sua reprodutividade e disponibilidade no mercado (APARECIDA, 2006).

Para que assim possam ser considerados, os biomateriais devem estar de acordo com a norma ISO 10993. Essa norma é um guia para seleção e testes de materiais que serão usados na confecção dos dispositivos. Por meio dela, avaliam-se as características do biomaterial, como as propriedades mecânicas, químicas, toxicológicas, biológicas, físicas, elétricas e morfológicas (ISO, 2012). Com o avanço da ciência, foram encontrados diversos materiais sintéticos utilizados para esse fim, nos quais incluem-se metais, polímeros, cerâmicas e, também, a combinação desses, os compósitos (ALMEIDA FILHO, 2008).

Desta forma, o conjunto de testes determinados pela norma ISO 10993 procura estabelecer duas propriedades importantes para os biomateriais, a biocompatibilidade e a biofuncionalidade. A **biofuncionalidade** é o conjunto de propriedades que permite ao material desempenhar uma função desejada, sendo diretamente interligada com as propriedades físicas do material, por exemplo, a resistência mecânica. Enquanto que a **biocompatibilidade**, em um aspecto multidisciplinar, refere-se à compatibilidade entre o material e o meio biológico no qual ele deve permanecer, sendo as propriedades toxicológicas essenciais para que não ocorram reações adversas, proporcionando habilidade de alcançar a função desejada com efetividade e respostas biológicas adequadas (BOSCHI, 1996; BASU; NATH, 2009). Ainda, segundo Willians (1992), a biocompatibilidade é a habilidade de um biomaterial ter um desempenho satisfatório com uma resposta tecidual satisfatória em uma aplicação específica, pois, como dito, os materiais devem produzir o mínimo de respostas biológicas adversas, sejam locais ou sistêmicas.

A diferença mais significativa entre um biomaterial e os outros tipos de materiais é sua habilidade em permanecer em um meio biológico sem prejudicá-lo e sem ter suas propriedades afetadas por ele. Nas últimas duas décadas, o grande progresso em termos de desenvolvimento de novos materiais ou refinamento na composição e microestrutura de materiais já existentes pode ser explicado através do entendimento de alguns conceitos como biocompatibilidade, resposta imunológica do organismo que o aloja e sua interação com as células humanas (BASU; NATH, 2009).

Existem três importantes aspectos relacionados à biocompatibilidade que os candidatos à biomateriais buscam alcançar nos mais diversos meios fisiológicos. Primeiramente, os biomateriais devem ser compatíveis bioquimicamente, atóxicos, não irritantes, não alergênicos e não carcinogênicos. Em segundo lugar, devem ser biomecanicamente compatíveis com os tecidos corpóreos circundantes. Por último, uma bioadesividade deve ser estabelecida entre o biomaterial e os tecidos corpóreos, sendo o resultado da não liberação de componentes prejudiciais ao organismo. É necessário enfatizar, no entanto, que a biocompatibilidade de um biomaterial depende do local de sua aplicação (BASU; NATH, 2009).

Por tratar-se de dispositivos aplicáveis a diversos órgãos e tecidos do corpo, os biomateriais estão presentes na rotina de diversos profissionais da saúde, a exemplo dos Cirurgiões Dentistas.

3.1.1 Biomateriais de Uso Odontológico

É constante e atual a procura por materiais restauradores estéticos e biologicamente aceitáveis, que apresentem as propriedades físicas e mecânicas similares às dos tecidos dentais naturais, além de serem econômicos e de fácil manipulação. Tal busca tem resultado no desenvolvimento tecnológico de materiais que possibilitem diferentes alternativas restauradoras (RUSSO *et al.*, 2010).

Em seres humanos, a maioria das reabilitações orais necessita do uso de tecidos duros (osso cortical) ou de materiais análogos (biomateriais), como metais de alta resistência ou cerâmicas de alta dureza (BASU; NATH, 2009). O expressivo desenvolvimento de biomateriais para utilização em clínica odontológica na última década tem representado um poderoso instrumento terapêutico, especialmente na substituição de elementos dentários perdidos por implantes odontológicos (BUGARIN JÚNIOR, 2007).

Todavia, a substituição de elementos dentários perdidos não é procedimento restrito de nossa época. Pesquisas antropológicas e arqueológicas mostram que nas comunidades primitivas já havia essa preocupação. Uma mandíbula de origem Maya, datada dos anos 600 d.C., continha três pequenos fragmentos de coral substituindo os dentes incisivos inferiores. Por meio de exames radiográficos, observou-se a formação de osso compacto em volta destes fragmentos. Dessa forma, esses foram considerados os mais antigos implantes aloplásticos colocados com sucesso em uma pessoa viva no mundo. Isso mostra que, desde muito tempo, utilizam-se materiais com desconhecida interação biológica, na intimidade dos tecidos bucais, para substituição de dentes perdidos (BULGARIN JÚNIOR; GARRAFA, 2007).

Conceitualmente, os implantes são dispositivos colocados em contato direto com o interior do corpo, visando auxiliar no cumprimento de determinadas funções total ou parcialmente perdidas. Para tanto, dois aspectos necessitam de consideração quanto à escolha do material com o qual o implante será

confeccionado: o funcional e o da aceitação pelo meio no qual o implante deve permanecer (APARECIDA, 2006).

A biocompatibilidade de um material para implante pode ser considerada adequada quando essa promove a formação de tecido normal na sua superfície, além de estabelecer com o meio biológico adjacente uma interface capaz de suportar as cargas normais ao local do implante (HENCH, 1993). A partir desse enfoque, os materiais chamados biocompatíveis podem ser classificados em biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis (VALLET, 1997).

Nenhum material implantado no corpo é totalmente inerte, todos induzem uma resposta do tecido hospedeiro (CAO, 1996). A resposta induzida pelos materiais chamados bioinertes e biotoleráveis, em relação ao tecido ósseo, é a encapsulação do implante por uma camada de tecido fibroso não aderente (HANAWA, 1991). A espessura dessa camada depende de muitos fatores, como: condições do implante, do tecido hospedeiro e da interface e das cargas mecânicas aplicadas sobre o implante. Nesse contexto, o titânio e suas ligas são definidos como bioinertes, enquanto que o aço inoxidável e ligas de Cr-Co, como biotoleráveis (CAO, 1996).

Os metais têm sido utilizados na Odontologia por centenas de anos como materiais substitutos da estrutura dentária perdida. O ouro em forma de folha talvez tenha sido o primeiro a ser usado como material para restauração dentária. Entretanto, os metais puros, incluindo o ouro, geralmente carecem de resistência suficiente para poderem ser usados como restaurações dentárias. Por esse motivo, vários metais são misturados para fornecer melhores propriedades físicas (CRAIG *et al.*, 2002).

Uma liga consiste na união íntima de dois ou mais elementos químicos na qual pelo menos um é metal, e cujas fases possuem propriedades metálicas (PHILLIPS, 2007).

A seleção de um material biocompatível deve iniciar com a identificação das propriedades requeridas para a aplicação em questão. Como essas propriedades são extremamente sensíveis a variações da estrutura do material em escala micro ou nanométrica, é fundamental que se tenha um entendimento de como se correlaciona a microestrutura com as propriedades desejadas (SOARES, 2002).

Nos tempos atuais, o titânio é o material de predileção na fabricação de implantes odontológicos, devido sua biocompatibilidade com os tecidos duros e

moles do sistema estomatognático, durabilidade, suscetibilidade a modificações, custo não tão elevado e resistência à corrosão (DOLL *et al.*, 2009).

Todavia, a bioatividade apresentada pelo titânio, o módulo de elasticidade desigual ao do osso, o provável acúmulo de íons e micropartículas no sítio do implante e as limitações clínicas reiteram a necessidade de empenho científico para aperfeiçoar o material atualmente em uso, através do desenvolvimento de novas ligas de Ti, que proporcionem adequadas propriedades biomecânicas. Desta forma, as ligas de Nitinol podem atender aos requisitos de biofuncionalidade através de variações na composição da liga, tratamentos térmicos e superficiais adequados, que resultam em propriedades mecânicas e biológicas favoráveis para utilização em implantes odontológicos (DOLL *et al.*, 2009; KOTENKO *et al.*, 2008).

Os materiais bioativos permitem uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo, possibilitando a formação de uma ligação química entre o tecido e o próprio material, também chamada por bioadesão (HANAWA, 1991). Nesse caso, o tecido é capaz de interagir com o material, sem a intervenção de tecido fibroso. Dentre esses materiais, destacam-se as cerâmicas a base de fosfato de cálcio (em especial, a hidroxiapatita) e os biovidros (ALMEIDA FILHO, 2008).

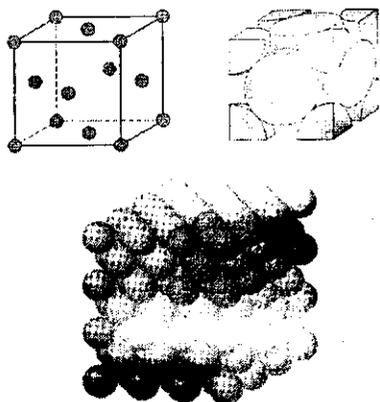
Por tratar-se de dispositivos aplicáveis a diversos órgãos e tecidos do corpo, os biomateriais estão presentes na rotina de diversos profissionais da saúde, a exemplo dos Cirurgiões Dentistas. Desta forma, a meta ideal da Odontologia Moderna é restaurar o paciente com contorno, função, conforto, estética, fonação e saúde ideais. Um cirurgião dentista fornece uma restauração, como modo de vida, quer seja removendo tecido cariado de um dente ou repondo vários dentes, por meio da reabilitação oral, agregado a ferramentas de diagnóstico, plano de tratamento, topografia dos implantes, materiais e técnicas (MISCH, 2006).

Diante disso, novos materiais têm sido propostos para utilização em implantes odontológicos, e entre eles está o Nitinol - liga composta por níquel e titânio.

3.2 Propriedades do Nitinol

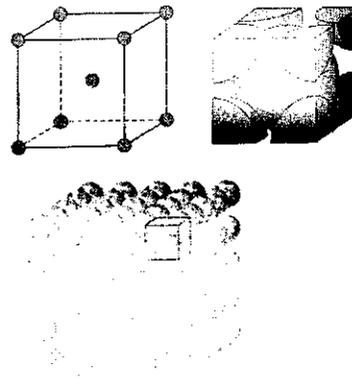
Ao observar as características de cada elemento que constitui a liga, pode-se entender de forma mais clara as características da liga propriamente dita. Com relação à estrutura cristalina tem-se o níquel com estrutura cúbica de face centrada (CFC) (Figura 1), sendo uma característica marcante sua alta estabilidade nessa fase, e o titânio com estrutura cúbica de corpo centrado (CCC) (Figura 2). A liga de Nitinol (*Nickel Titanium Naval Ordnance Laboratory*) é caracterizada por uma solução sólida substitucional (Figura 3), onde os átomos compartilham uma única rede comum de posições atômicas (GELAIN *et al.*, 2006; CATÃO, 2011).

Figura 1: Estrutura cristalina do Níquel



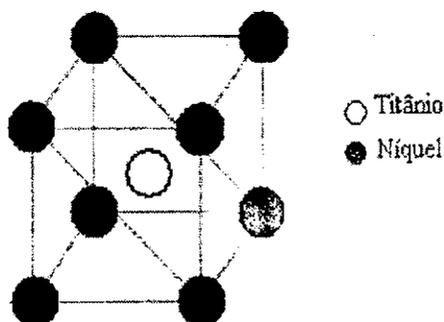
Fonte: WAYMANN; DUERIG, 1990.

Figura 2: Estrutura cristalina do Titânio



Fonte: WAYMANN; DUERIG, 1990.

Figura 3: Estrutura cristalina de liga de NiTi



Fonte: WAYMANN; DUERIG, 1990.

O titânio puro é um metal bastante reativo e extremamente oxidável, exigindo técnicas não convencionais de beneficiamento, fusão e fundição, explicando o porquê de seu valor relativamente alto de mercado. No meio biológico, o titânio é bem tolerado pelos tecidos, proporcionando grande aplicação biomédica e odontológica. A biocompatibilidade do titânio explica-se, em parte, pela formação de um denso óxido superficial e de caráter químico anfótero, que se forma quando o titânio é exposto ao ar, gerando estabilidade em meios corrosivos. Apesar da boa tolerância pelo organismo, o titânio pode ser tóxico, devido ao fato de seus íons não permanecerem apenas nas proximidades de onde o metal foi implantado, sendo transportados pelos vasos sanguíneos e linfáticos, células e fluidos para tecidos distantes, podendo causar desde descoloração tecidual até necrose estéril (YAHIA, 2000).

Por outro lado, o titânio, quando em contato com oxigênio, forma uma camada de óxido altamente resistente em sua superfície. O óxido de titânio (TiO_2) é um denso óxido de caráter anfótero formado na superfície do biomaterial quando o mesmo é exposto a oxigênio, gerando estabilidade em meios corrosivos, o que justifica sua biocompatibilidade (YAHIA, 2000).

O níquel puro é utilizado em ligas metálicas por causa de sua flexibilidade e baixo ponto de fusão, características que conferem à liga de Nitinol, em determinadas concentrações, um módulo de elasticidade próximo ao do osso. Os implantes odontológicos feitos unicamente em titânio possuem um módulo de elasticidade alto e incompatível com o tecido ósseo humano, ocasionando em maior possibilidade de fratura (CATÃO, 2011).

A liga de Nitinol pertence a uma classe de materiais denominada ligas com memória de forma. O efeito memória de forma e a superelasticidade são propriedades associadas à natureza cristalograficamente reversível das transformações martensíticas que ocorrem nas ligas com memória de forma. As bases para a vasta aplicação da liga podem ser sintetizadas com as seguintes propriedades: Histerese, Memória de Forma Térmica, Superelasticidade (memória de forma mecânica) e Biocompatibilidade.

O diagrama de fases do Nitinol, representado na figura 4, evidencia a região central, limitada pelas fases Ti_2Ni e TiNi_3 , onde encontra-se a fase de interesse para a aplicação como biomaterial (OTSUKA, WAYMAN, 1998; FIGUEIREDO, 2006).

As propriedades singulares presentes no Nitinol têm possibilitado aplicações nas indústrias médica e odontológica. Suas particularidades são causadas por transformações envolvendo as fases martensita e austenita. Essas propriedades podem ser modificadas por mudanças na composição da liga, trabalho mecânico e tratamentos térmicos. A fase austenítica (Figura 6) possui estrutura cristalina do tipo cúbica de corpo centrado (CCC), ocorre em altas temperaturas, baixas tensões e apresenta menor elasticidade que a fase martensítica. Esta última (Figura 5) apresenta uma estrutura monoclinica, triclínica ou hexagonal, forma-se em baixas temperaturas e altas tensões e apresenta menor rigidez estrutural (CATÃO, 2011; MIYAZAKI; SACHDEVA, 2009; FIGUEIREDO, 2006; MERTMANN, 2000).

Figura 4: Diagrama de fases do NiTi

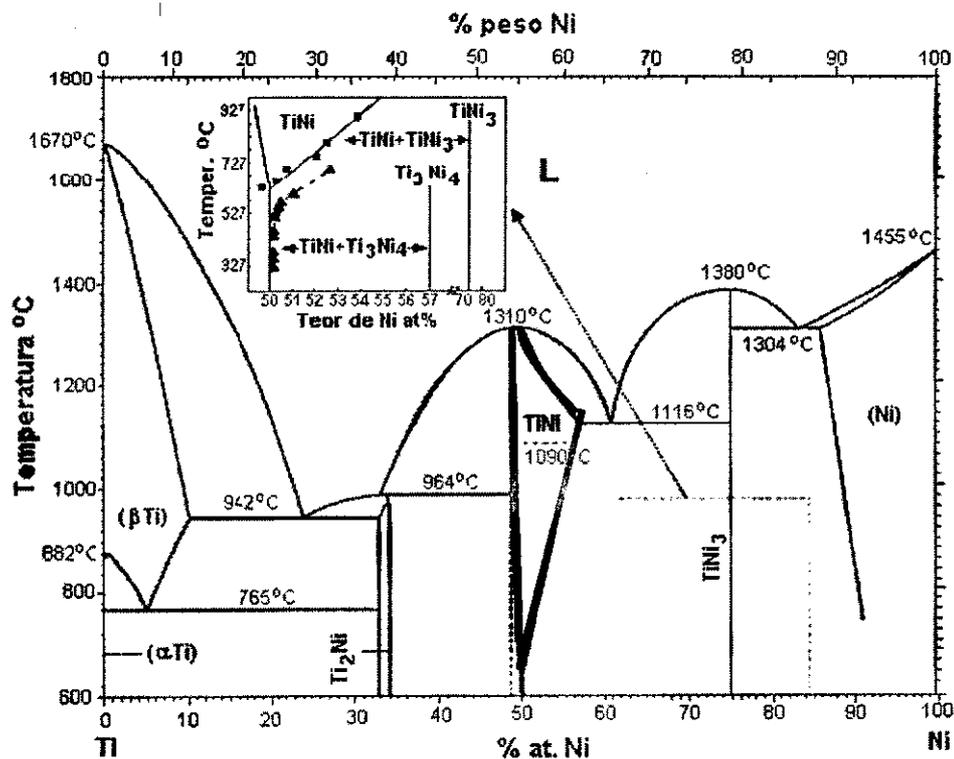
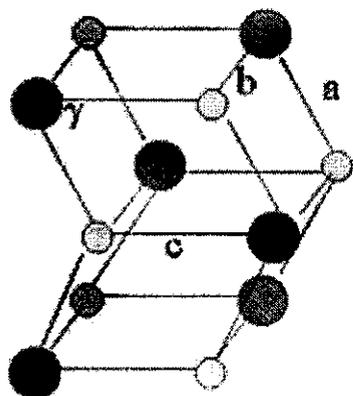
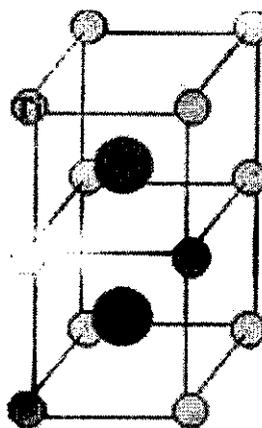


Figura 5: Estrutura monoclinica do Nitinol na fase martensita.



Fonte: Adaptado de Wayman, Duerig (1990).

Figura 6: Estrutura cristalina do Nitinol na fase austenita.

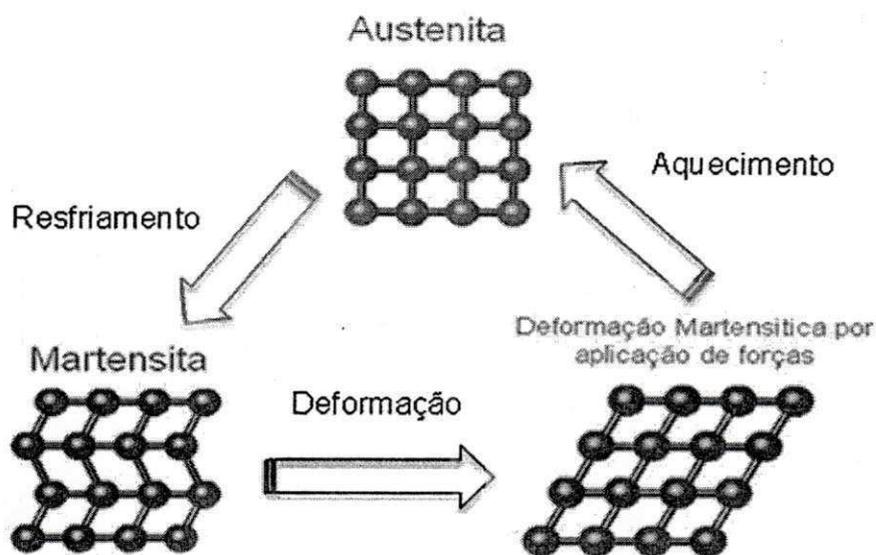


Fonte: Adaptado de Wayman, Duerig (1990).

A transição da estrutura austenítica para a martensítica da liga de Nitinol promove um rearranjo dos átomos de Ni e Ti, provocando uma expansão da liga e, no sentido contrário, promove uma contração. O fator de empacotamento na fase austenítica é maior (0,692) do que na fase martensítica (0,535), por isso a relevância do conhecimento da estrutura cristalina da liga nas diferentes fases, para melhor entendimento das propriedades mecânicas do material, pois um maior fator de empacotamento determina uma maior rigidez do material (OTSUKA; REN, 1999; CATÃO, 2011).

A transformação de fase austenítica para martensítica, em princípio é quem caracteriza o efeito memória de forma (EMF), que consiste na habilidade do material em memorizar sua forma depois de deformado plasticamente e retornar ao seu formato original com o aquecimento. No caso das ligas com memória de forma (LMF), a transformação martensítica é reversível e termoelástica, o que leva a recuperação de forma imposta pela deformação plástica. A transformação martensítica termoelástica que ocorre no interior do material durante um ciclo termomecânico de EMF (resfriamento→deformação→aquecimento) está ilustrada na figura 7 (OTSUKA, WAYMAN, 1998).

Figura 7: Ciclo de transformações de fases da liga de Nitinol.



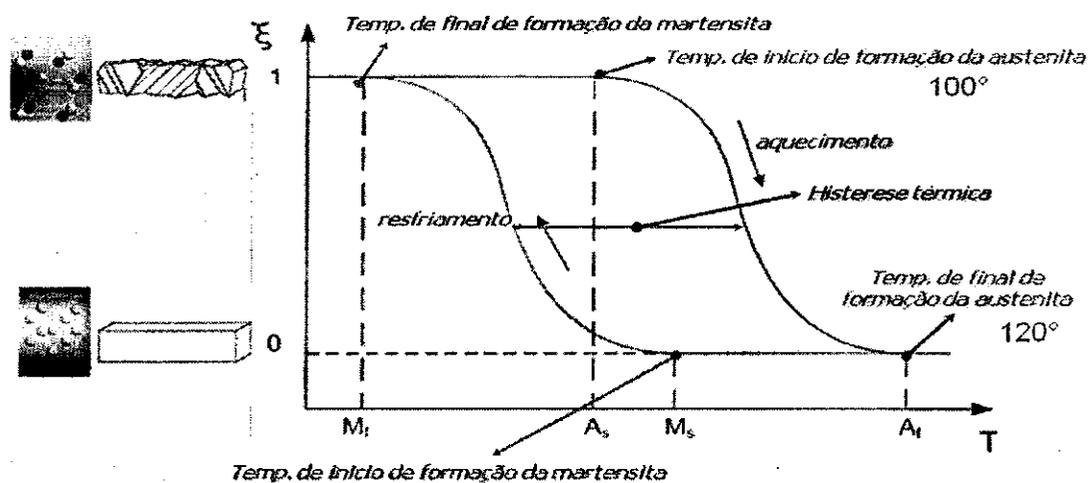
Fonte: SILVA, 2009.

3.2.1 Histerese Térmica

O intervalo de temperatura da transformação martensita-austenita que acontece durante o aquecimento, é um pouco maior que a transformação no resfriamento. A diferença entre as temperaturas de transformação no aquecimento e resfriamento é chamada de histerese. Histerese é geralmente definida como a diferença entre as temperaturas em que o material está 50% transformado em austenita no aquecimento e 50% transformado em martensita no resfriamento. A transformação de fase inerente é a base para as propriedades peculiares desta liga, em particular, memória de forma e superelasticidade (RYHÄNEN, 1999; ZHOU *et al.*, 2000; CATÃO, 2011).

As temperaturas críticas da transformação são: M_s : Temperatura de início de transformação martensítica; M_f : Temperatura de final da transformação martensítica; A_s : Temperatura de início da transformação austenítica; A_f : Temperatura final da transformação austenítica; H_f : Histerese da transformação (Figura 8) (RYHÄNEN, 1999).

Figura 8: Gráfico representativo da Histerese.



Fonte: ARAÚJO, 2009.

3.2.2 Efeito Memória de Forma (EMF)

As ligas metálicas com Efeito Memória de Forma possuem capacidade de adaptação a estímulos externos como carregamentos ou temperaturas. A principal característica dessas ligas é a habilidade de memorizar configurações originais após terem sido deformadas; por aquecimento, as ligas recuperam grandes deformações. Sua habilidade de sustentar grandes forças e deformações, para alterar sua forma, para mudar sua dureza e recuperar características com a mudança de temperatura ou aplicação de carga, e o potencial para agir como acionadores, têm feito destas ligas excelentes candidatas para aplicações estruturais ativas e inteligentes (LAGOUDAS *et al.*, 1999; CATÃO, 2011).

Quando uma liga com memória de forma está em sua forma martensítica, ela é facilmente deformada para uma nova forma. Entretanto, quando a liga é aquecida através da sua temperatura de transformação, ela reverte para austenita e recupera sua forma inicial com grande força (MERTMANN, 2000).

3.2.3 Superelasticidade

O Nitinol é capaz de suportar grandes deformações quando submetido a tensões, mas volta a sua forma original quando a tensão aplicada cessa (FREIHERR, 1998; CATÃO, 2011).

O módulo de elasticidade é a medida da rigidez de um material, sendo indicada pela razão entre tensão e deformação. O Nitinol, quando na fase martensítica, apresenta módulo de elasticidade próximo ao do tecido ósseo humano (Tabelas 1 e 2). Em implantes odontológicos, essa propriedade favorece uma melhor aceitação do material pelo organismo e baixos índices de fratura tanto do material quando do osso que o aloja, já que esta propriedade pode permitir a dissipação das forças e redução de impacto durante a mastigação (GEETHA *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Propriedades do Nitinol comparadas às propriedades de outros compostos.

	NiTi		Aço Inox	Titânio	Ti-6Al-4V
	Austenita	Martensita			
Tensão máxima (MPa)	800 – 1500	103 – 1100	483 - 1850	540 – 740	920 – 1140
Tensão de escoamento (MPa)	100 – 800	50 – 300	190 – 1213	390	830 – 1070
Módulo de Elasticidade (GPa)	70 – 110	21 – 69	190 – 200	105 – 110	100 – 110
Elongação à Fratura (%)	1 - 20	Acima de 60	12 - 40	16	8

Tabela 2 - Módulo de Elasticidade de alguns compostos comparados aos valores existentes em segmentos do dente e osso humanos.

Materiais	10³MPa
Alumina-Cerâmica	380.4
Liga de Co-Cr	218.7
Ti-6Al-4V	113.8
CpTi	103.4
Esmalte	84.1
Dentina	18.3
Osso	16.5

A liga Nitinol está classificada entre os materiais metálicos com alta capacidade de amortecimento (VANDEURZEN *et al.*, 1981). Essa elevada capacidade de amortecimento é atribuída à mobilidade da interface martensita/austenita e contornos de maclas apresentados por essas ligas. As ligas de base Nitinol possuem alta capacidade de amortecimento durante a transformação de fase e na fase martensítica, ao passo que sua fase austenítica manifesta uma dissipação de energia bem mais baixa (LU *et al.*, 2003).

3.2.4 Biocompatibilidade das ligas de Nitinol

Os átomos de níquel são ligados quimicamente aos de titânio, estabelecendo uma forte ligação intermetálica, o que torna o risco de reação com o organismo extremamente baixo, até mesmo em pacientes com sensibilidade ao níquel (MERTMANN, 2000).

Várias pesquisas têm sido realizadas sobre a biocompatibilidade de Nitinol uma vez que essas ligas têm mais níquel do que o aço inoxidável, causando preocupação porque o níquel é considerado tóxico. Entretanto, como o Nitinol é um composto intermetálico e não uma liga no sentido metalúrgico (solução sólida), a força de ligação entre níquel e titânio é muito maior do que entre os elementos da liga de aço inoxidável. Por outro lado, o Nitinol forma em sua superfície uma camada de TiO_2 (óxido de titânio), gerando forte estabilidade à liga, visto ser um dos óxidos conhecidos mais estáveis, sendo essa camada de óxido ausente de níquel. Teste de polarização em solução de Hank têm repetidamente mostrado que o Nitinol é quimicamente mais estável e menos susceptível a corrosão que aço inoxidável (SPECK, 1980).

Pelo fato de as ligas dentárias ficarem em contato com os dentes e com os tecidos orais por longos períodos, a sua compatibilidade é de grande interesse. A biocompatibilidade das ligas dentárias está principalmente relacionada com a sua corrosão. Se uma liga metálica sofre corrosão, ela irá liberar seus elementos na boca e aumentar o risco de reações indesejáveis nos tecidos orais. Essas reações indesejáveis incluem gosto desagradável, irritações, alergias entre outras. Infelizmente, a relação entre a liberação de elementos dessas ligas e as reações

teciduais ainda não são bem definidas, resultando numa falta de entendimento das pessoas sobre a liberação de metais dessas ligas. Um importante fato a ser lembrado é que as ligas, sem considerar a sua composição, sempre liberam alguma quantidade de elementos na boca (CRAIG *et al.*, 2002).

As ligas de Nitinol têm sido estudadas desde 1963, mas somente em meados de 1990 os produtos fabricados com Nitinol passaram a ser comercializados e empregados na área clínica. O uso do Nitinol como um biomaterial torna-se atrativo devido à superelasticidade e efeito de memória de forma, que são propriedades novas em comparação com as ligas metálicas convencionais (RYHÄNEN, 1999; CATÃO, 2011).

Dessa forma, apesar das propriedades mecânicas superiores do titânio e suas ligas e da resistência à corrosão, estabilidade e biocompatibilidade conferidas pelo filme de óxido, estes materiais são bioinertes frente ao meio biológico. Assim, torna-se necessária a utilização de métodos de modificação de superfície para melhorar a atividade biológica destes materiais e favorecer a formação óssea (APARECIDA, 2004; STEINEMANN, 1994).

3.3 Modificação de Superfície

A utilização de metais ou ligas metálicas para aplicações médicas e odontológicas requer condições estruturais e superficiais que propiciem funcionalidade e biocompatibilidade. A liga de Nitinol pode atender a estes requisitos através de tratamentos de superfície adequados e que resultem em propriedades físico-químicas e biológicas favoráveis.

No caso dos implantes dentários, os materiais utilizados na sua fabricação podem ser classificados de dois modos diferentes. Do ponto de vista químico, os materiais para implantes dentais podem ser classificados como metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. Podem também ser classificados pelo tipo de resposta biológica que induzem nos tecidos aos quais são implantados, sendo classificados como biotolerados, bioinertes e bioativos. Os diferentes níveis de biocompatibilidade reforçam o fato de que nenhum material é completamente aceito pelo organismo do receptor (SYKARAS *et al.*, 2000) portanto, controlar as características da superfície dos biomateriais significa controlar a resposta biológica (LACEFIELD, 1999).

Com o objetivo de aumentar a área de superfície e a qualidade de adesão da interface osso-implante, têm sido propostos processos de modificação de superfície, baseados no princípio de que uma melhor e mais rápida osseointegração pode ser alcançada por meio da alteração topográfica do implante (KLOKKEVOLD *et al.*, 1997).

Assim, os fatores especialmente importantes para que se estabeleça a osseointegração são: a biocompatibilidade do material; o formato do implante; sua adaptação ao leito receptor; a qualidade da superfície; o estado de saúde do tecido ósseo, a técnica cirúrgica aplicada e o controle das condições de carga que o implante irá receber (ALBREKTSSON *et al.*, 1981).

As propriedades macroscópicas e microscópicas da superfície dos implantes têm um papel fundamental no processo de cicatrização óssea após sua instalação (ZECHNER *et al.*, 2003). A superfície do implante determina, em grande parte, a resposta biológica quando da sua implantação no tecido vivo (LACEFIELD, 1999). O conceito de qualidade da superfície depende de suas propriedades físicas e químicas (WENNERBERG *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 2003).

A criação de uma interface entre a liga de titânio e tecido ósseo envolve uma interação entre os constituintes moleculares do sistema biológico e os átomos superficiais do biomaterial, e dependendo dos seus desempenhos, a resposta final pode ser funcional ou não funcional. Com a resposta do tecido frente a uma superfície, estão envolvidos processos de inflamação, cicatrização e adesão celular, além das características ósseas, a presença de água, íons, macromoléculas e células. Com o biomaterial, podem-se relacionar a estrutura e as propriedades da superfície, a liberação de produtos da corrosão, a energia de superfície e a estabilidade da camada de óxidos (BRUNSKI, 1988; KASEMO, LAUSMAA, 1987).

A função primária da interface entre osso e biomaterial é proporcionar uma transferência efetiva e segura de carga através do implante para o tecido ósseo. Essa interação é governada por uma superfície de óxido de 2,0 a 5,0 nm que cobre o titânio e formada imediata e espontaneamente quando o titânio é exposto ao ar ou à água. Evidências suportam a hipótese de que a interface é fortemente influenciada por fatores biomecânicos, tendo maior ascendência na regeneração óssea do que as propriedades do biomaterial (KASEMO, LAUSMAA, 1987).

A propriedade macroscópica que depende da ligação em torno da região interfacial dos materiais é chamada de adesão. A bioadesão é obtida com o uso de um material bioativo, o qual produz a união entre o implante e o osso. O implante precisa ter uma estrutura superficial micromorfológica rugosa ou porosa, não só para assegurar o travamento do osso na superfície do implante, como também, auxiliar a osseointegração (ALENCAR, 2002).

Considerando que a biocompatibilidade e em especial os mecanismos envolvidos na osseointegração dependem da interação das células com a superfície do biomaterial, é importante analisar a molhabilidade da superfície e os parâmetros que a influenciam (COUTINHO, 2007).

Segundo Eisenbarth *et al.* (1996) é de suma importância o conhecimento das propriedades da superfície dos biomateriais, mais precisamente no que diz respeito às propriedades de adesão e molhabilidade. Os autores salientam que para que se determinem tais propriedades, existem técnicas, dentre as quais se podem citar a que mede o ângulo de contato resultante entre uma gota de um líquido depositado sobre a superfície do material. Com a medida do ângulo formado por esta gota e com auxílio de modelos físico-matemáticos é possível inferir sobre os valores da energia de superfície.

Estudos realizados por Hallab *et al.* (2001) demonstraram que a energia livre de superfície é a característica mais importante do que a rugosidade da superfície para induzir a adesão celular e proliferação.

A molhabilidade das superfícies pode ser quantificada pelo ângulo de contato de um líquido com o substrato sólido. A molhabilidade da superfície é largamente dependente da energia de superfície e influencia o grau de contato entre o implante e o ambiente fisiológico; quanto maior a rugosidade, melhor a molhabilidade, maior é a interação da superfície do implante com o ambiente biológico (EISENBARTH *et al.*, 1996).

Considerando que tanto a osseointegração quanto a molhabilidade dependem da rugosidade das superfícies, a análise destas propriedades faz-se importante, já que a rugosidade possibilita o aumento da área superficial, afeta o coeficiente de atrito e proporciona a retenção mecânica de materiais estranhos (COUTINHO, 2007).

e nitrogênio, devido à atmosfera ambiente) ocorrerá em direção ao metal sob ablação (ALMEIDA FILHO, 2008).

3.3.2 Deposição de Apatitas pelo Método Biomimético

Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos com razões Ca/P variadas. Dentre elas, as cerâmicas de apatita são as mais estudadas. Apatita é o nome de uma vasta série de minerais isomorfos. O nome "apatites", do grego, enganadora, justifica as dificuldades envolvidas na sua identificação devido à sua falta de estequiometria. As apatitas são formadas sob condições variadas, mas comumente ocorrem como minerais agregados a rochas ígneas. Elas também ocorrem em rochas sedimentares marinhas formadas por deposição química, em fósseis e em rochas metamórficas. Variam amplamente em tonalidade, desde o transparente, passando pelo amarelo, verde, marrom, vermelho e azul. Algumas apatitas exibem uma fluorescência amarela sob luz ultravioleta. Os cristais são hexagonais, prismáticos e podem se tornar alongados sempre terminando em faces dipiramidais (ALMEIDA FILHO, 2008).

Estudos de difração de raios X e análise química em 1926 identificaram a fase mineral da dentina, esmalte e osso como sendo fosfato de cálcio com uma estrutura de apatita, idealizada como $(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, ou seja: hidroxiapatita. No entanto, tem sido discutida a não estequiometria bem como a presença de elementos substitutivos na fase mineral do esmalte, dentina e osso (ALMEIDA FILHO, 2008).

Existe hoje uma enorme variedade de materiais de fosfatos de cálcio, que são muito utilizados na medicina, odontologia e até na veterinária, graças as suas propriedades físico-químicas estes materiais respondem de forma satisfatória e específica de cada um e requerem indicações e aplicações adequadas (ALMEIDA FILHO, 2008).

A interação dos implantes de titânio com o tecido ósseo pode ser melhorada e acelerada pela presença de íons cálcio e fosfato na superfície destes materiais, pois, o processo de osseointegração é iniciado pela troca destes íons entre o material sintético e o meio biológico (APARECIDA, 2006).

Geralmente, materiais implantados em defeitos ósseos estão sujeitos ao encapsulamento por tecido fibroso, isolando assim o material do osso circundante.

Apenas alguns tipos de cerâmicas têm a capacidade de ligação com o osso vivo sem sofrer tal encapsulamento (KOKUBO *et al.*, 1996).

A preparação e modificação de superfícies com recobrimentos bioativos têm despertado o interesse em explorar o potencial de métodos simples, que utilizam soluções aquosas e baixa temperatura (<100 °C). O material bioativo amplamente utilizado como recobrimento é a hidroxiapatita – HA, uma cerâmica do sistema dos fosfatos de cálcio e principal componente mineral do tecido ósseo (APARECIDA, 2006).

O recobrimento de implantes metálicos com materiais bioativos, como hidroxiapatita (HA), cuja composição estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, visa acelerar os estágios iniciais de formação óssea no processo de osseointegração, aumentando o percentual de contato entre osso e implante e aumentando a estabilização do implante no período pós-implantação (ONG *et al.*, 2004; PRETORIUS *et al.*, 2005).

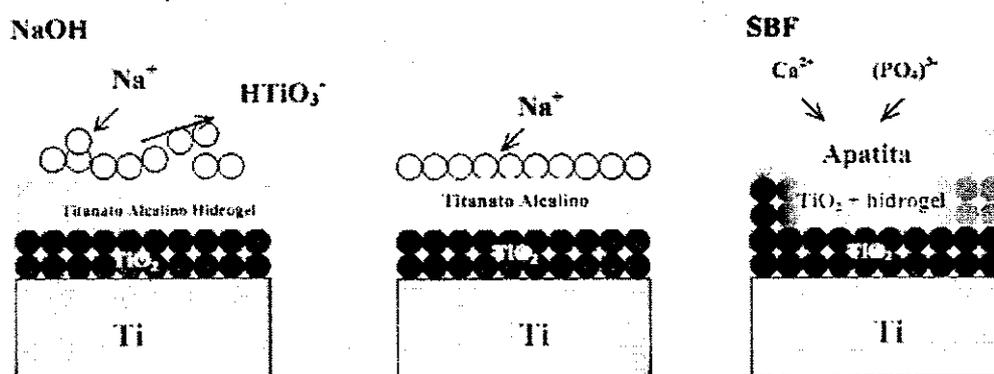
A hidroxiapatita é uma cerâmica formada basicamente por cálcio e fosfato e é encontrada em abundância no esmalte dentário, na dentina e nos ossos. O interesse na sua utilização para o recobrimento de implantes deve-se ao fato de sua composição química ser semelhante à fase mineral do tecido ósseo (CAULIER *et al.*, 1997). Na sua forma estequiométrica é aplicada a um substrato metálico (Ti cp ou $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$), frequentemente pelo método de aspensão térmica por plasma, para formar um recobrimento bioativo que, quando implantado no tecido ósseo, pode ligar-se quimicamente ao tecido ósseo adjacente (STRNAD *et al.*, 2000; GIAVARESI *et al.*, 2003a; b) e acelerar o processo de aposição óssea (JEFFCOAT *et al.*, 2003; DE ALMEIDA *et al.* 2005).

Com o objetivo de melhorar a união entre os recobrimentos de HA e as superfícies de implantes, processos químicos alternativos vêm sendo desenvolvidos (KOKUBO *et al.*, 1996; SENA *et al.*, 2002).

O processo de deposição biomimética se baseia na precipitação heterogênea de fosfatos de cálcio sobre substratos, metálicos ou não, por meio da imersão desse substrato, por vários dias, em soluções que simulam o plasma humano (SBF – *Simulated Body Fluid*). No caso em que a deposição seja realizada em um substrato metálico, p. ex. titânio e suas ligas, o metal é previamente ativado em uma solução alcalina, geralmente NaOH, para formação de uma camada de titanato de sódio em

substituição ao óxido de titânio presente originalmente na superfície do metal. Em seguida, o substrato é colocado em uma solução saturada em cálcio para que se forme uma camada de titanato de cálcio em substituição ao titanato de sódio, e quimicamente unida ao metal do corpo do implante. Finalmente, quando este substrato é imerso em solução SBF, por meio do mecanismo de precipitação heterogênea, deposita-se uma camada de HA na superfície do implante, sendo posteriormente sinterizada. Estes procedimentos ativam a superfície do metal acelerando o processo de nucleação e crescimento de fosfato de cálcio (Figura 9) (KOKUBO *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 2002). No processo biomimético, a nucleação e crescimento de fosfatos de cálcio criam camadas intermediárias que garantem uma união química do recobrimento com o substrato, com uma espessura que varia entre 1 e 5 μm (DE GROOT, 1998).

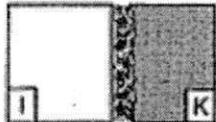
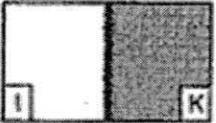
Figura 9: Representação esquemática da evolução estrutural da ativação da superfície do titânio obtida através de tratamento químico em solução de NaOH.



Fonte: ALMEIDA FILHO, 2008.

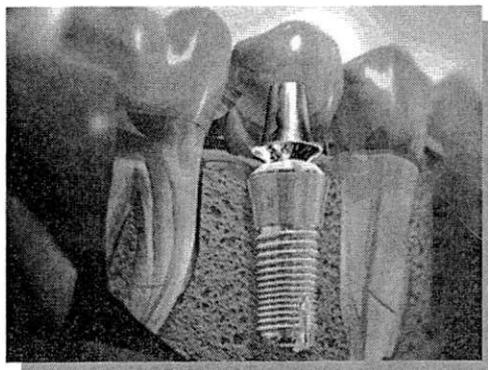
científica no que diz respeito à influência das propriedades físico-químicas dos materiais (ALBREKTSSON *et al.*, 1993). Um material ideal para ser utilizado em implantodontia deve possuir capacidade de adesão firme ao tecido ósseo e apresentar características mecânicas adequadas ao desempenho das funções dos tecidos ou órgãos dentários que visa substituir (OHGUSH *et al.*, 1992).

Figura 10: Possíveis reações histológicas na interface osso/implante para vários materiais para implante.

Material	Implante Tecido	Aparência histológica da "interface"	Tipo de osteogênese
1 Aço inoxidável; Liga de Co-Cr-Mo; Liga de ouro, PMMA (biotolerados)		Cápsula de tecido conjuntivo (cicatriz fibrosa), possível osteóide ou contato condróide	Osteogênese distante
2 Titânio, Tântalo; Óxido de Alumínio; cerâmica (bioinertes)		Contato entre osso e superfície do implante	Osteogênese de contato
3 Biovidros; Biocerâmicas; Fosfatos de Ca; Apatita (bioativos)		União química ao osso	Osteogênese de união verdadeira
4 Titânio com superfície áspera, p. ex., revestimentos aspersão térmica (bioinertes e de "estrutura osteotrópica")		União físico-química ao osso	Osteogênese

FONTE: SCHROEDER, 1994.

Figura 11: Substituição do dente ausente através de biomaterial metálico – implante odontológico.



FONTE: <http://www.google.com.br>

4 MATERIAIS E MÉTODOS

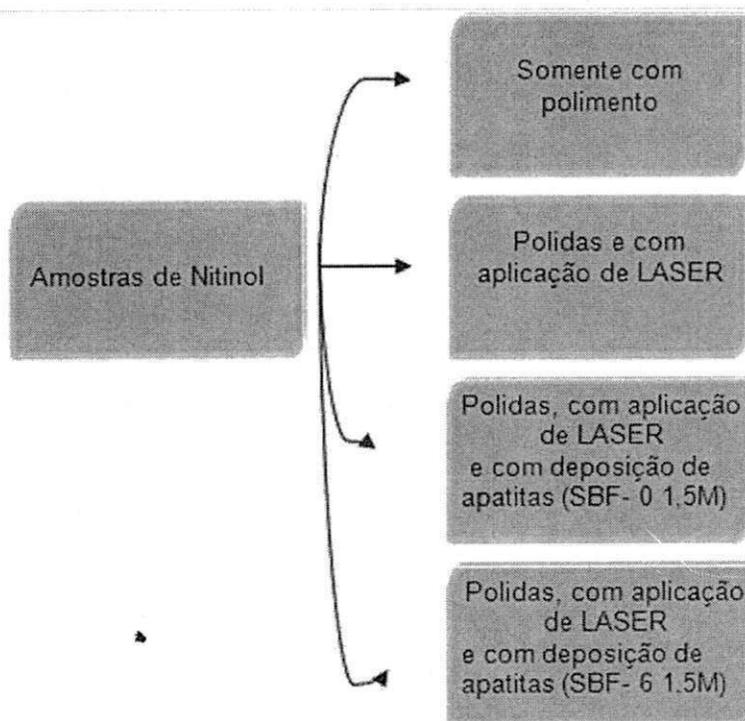
4.1 Materiais

O titânio comercialmente puro (Ti cp) é classificado em graus 1, 2, 3 e 4, de acordo com a norma ASTM F67-88 designada para normatização de biomateriais, em concordância com a finalidade de uso dos mesmos. A diferença fundamental entre os graus de Ti cp está baseada na variação da quantidade de oxigênio, nitrogênio e ferro presentes na composição deste material.

Foram analisadas ligas de Nitinol classificadas em três tipos, de acordo com sua composição: equiatômicas (55% Ni - 45% Ti em peso); com maior concentração em Níquel (55,3% Ni - 44,7% Ti em peso) e com maior concentração em titânio (54,7% Ni - 45,3% Ti em peso).

Cada composição foi subdividida em 4 grupos, a depender do tipo de tratamento de superfície realizado, de acordo com o esquema (Figura 12):

Figura 12 - Esquema de classificação das amostras, segundo os tratamentos de superfícies realizados.



4.2 Preparação das amostras

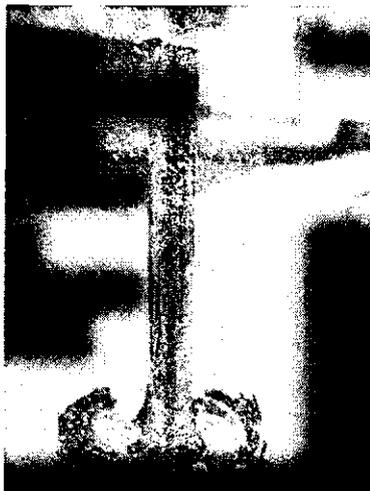
4.2.1 Obtenção da Liga de Nitinol

As amostras de Nitinol foram fabricadas no Laboratório Multidisciplinar de Materiais e Estruturas Ativas (LaMMEA), localizado na Universidade Federal de Campina Grande, com composições nominais selecionadas a partir de ligas comerciais na área biomédica. Os elementos usados na composição da liga foram: níquel comercial puro e titânio comercialmente puro grau 4, de acordo com a ASTM F67-88.

Inicialmente, os elementos puros foram pesados em uma balança de precisão. Sequencialmente foi utilizado um forno de fusão a plasma da marca *Discovery All* da EDG Equipamentos, que utiliza o plasma térmico como meio de transmissão de energia para fundir metais como titânio, níquel, cromo e cobalto. A técnica utilizada foi a Plasma *Skull Push Pull* de fusão, que consiste na fundição do material sobre uma fina camada dele mesmo, evitando, assim, que ele se contamine com o material do cadinho.

Na técnica Skull de fusão, os elementos foram colocados em um cadinho de cobre dentro do forno de fusão em ordem decrescente de ponto de fusão ($Ti \approx 1700^{\circ}C$ e $Ni \approx 1400^{\circ}C$). Um eletrodo rotativo de tungstênio origina uma tocha de plasma em atmosfera de argônio que provoca a fusão dos elementos puros, formando o botão da liga com memória de forma (LMF). Estando o metal completamente fundido, realizou-se automaticamente a injeção em uma coquilha cilíndrica de alumínio, formando-se bastões de Nitinol (Figura 13) que foram seccionados e deram origem às amostras propriamente ditas.

Figura 13 - Bastão de Nitinol ao sair do forno de fusão



4.2.2 Obtenção das pastilhas de Nitinol

Após a fundição da liga e obtenção dos bastões de Nitinol, foram confeccionadas pastilhas cilíndricas planas de 5mm de diâmetro por 2mm de espessura (Figura 15) através de cortes transversais dos bastões por discos diamantados da marca Buehler (Figura 14) acoplados à máquina de corte Isomet 1000, da mesma empresa.

O polimento das amostras foi realizado mecanicamente, utilizando-se lixas de óxido de alumínio (lixas d'água) nas granulações 180, 240 e 500, sendo a primeira da marca Double A e as duas subsequentes da marca 3M, nesta ordem de utilização (Figura 16). Após o alisamento superficial, as amostras foram limpas com água destilada e secas com papel absorvente.

Figura 14 - Cilindro de Nitinol sendo seccionado por disco diamantado

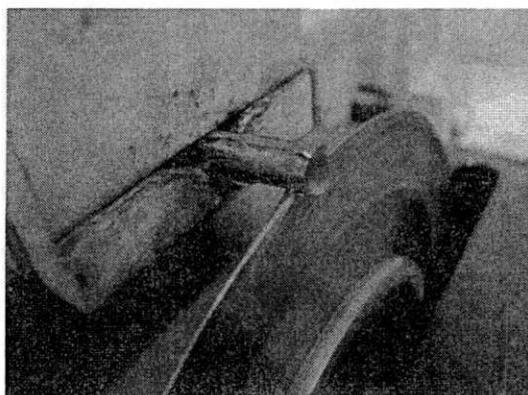


Figura 15 - Pastilhas de Nitinol



Figura 16 - Polimento das pastilhas de Nitinol em lixa de óxido de alumínio.



4.2.3 Modificação da superfície pelo laser Ytterbium pulsado

Após a etapa de polimento, parte das amostras, conforme gráfico apresentado na figura 12, foi submetida à modificação de sua superfície pelo Laser Ytterbium pulsado (Yb), através do equipamento OmniTek (Figura 17) que funciona em união ao programa OmniMark 20F, versão 2.0.0, da empresa OmniTek Tecnologia Ltda. A irradiação deu-se em apenas uma superfície (Figura 18), que foi alvo das caracterizações. Os parâmetros do feixe de laser, como potência e frequência, foram mantidos fixos (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros fixos utilizados na irradiação pelo Laser Ytterbium pulsado

Parâmetros fixos	
Potência	Frequência
140 W	20 Hz

Figura 17 - Equipamento OmniTek

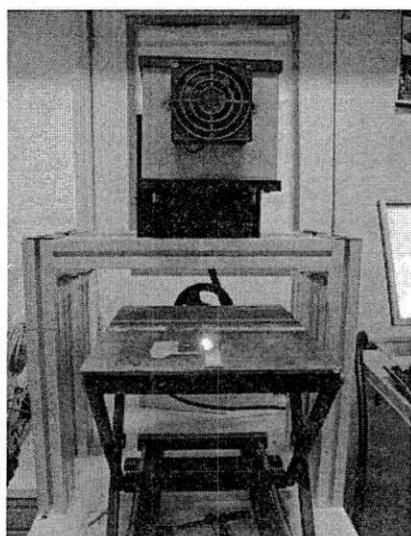
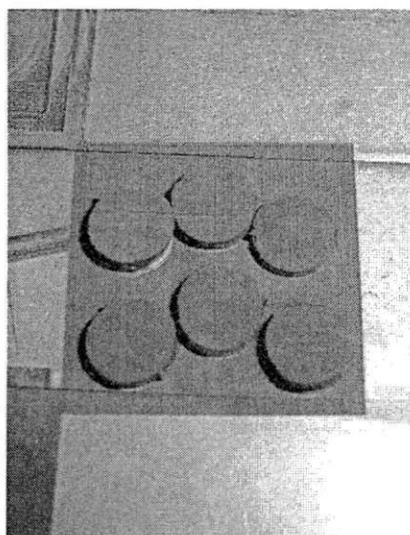


Figura 18 - Superfície da pastilha de Nitinol irradiada pelo Laser Ytterbium pulsado.



4.2.4 Ataque Alcalino

Sequencialmente à modificação superficial por laser, as amostras foram imersas em água destilada e submetidas à Lavadora Ultra-sônica da marca Unique, por 10 minutos (Figura 19), com o intuito de eliminar impurezas adquiridas durante a irradiação.

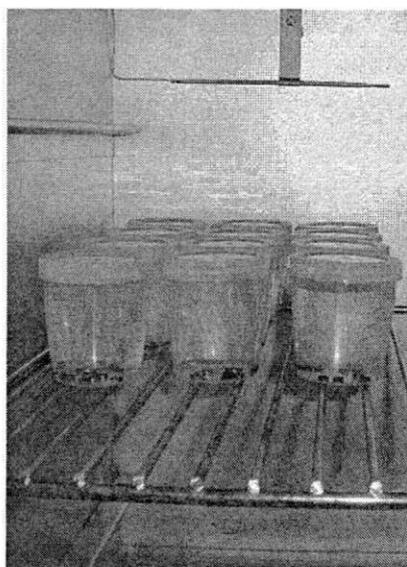
Previamente à deposição de apatitas pelo método biomimético, devido ao material utilizado, as amostras receberam ataque químico através de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a uma concentração de $5,0 \text{ Mol.L}^{-1}$ por 24 horas a 60°C (Figura 20). Cada amostra ficou imersa em um recipiente contendo 50 mL da solução. Após o período de ataque, as amostras foram removidas da solução,

lavadas com água destilada e secas em estufa a 60°C por 3 horas. Além da secagem, esse último procedimento visou também a densificação da camada de titanato de sódio, induzindo a nucleação de apatitas. O ataque alcalino tem em vista a ativação da superfície e formação de titanato de sódio, que é mais reativo que o óxido de titânio, o que propicia uma deposição mais satisfatória de apatitas na superfície do biomaterial.

Figura 19 - Amostras imersas em água destilada dentro da Lavadora Ultra-sônica.



Figura 20 - Ataque químico superficial utilizando-se hidróxido de sódio.



4.2.5 Deposição de apatitas sobre a superfície do Nitinol modificada por laser

Sequencialmente ao ataque alcalino, parte das amostras foi imersa em Solução Biomimética (SBF-0 ou SBF-6), conforme esquema apresentado na figura 1, para deposição de apatitas em sua superfície. Cada amostra ficou imersa em 75 mL de solução com concentração de 1,5 M e pH 7,4 (Figura 21), permanecendo em estufa a 37°C por 7 dias, com troca de solução em 24, 48 e 48 horas, com a intenção de manter a concentração de íons em solução. Para cada variável de tratamento superficial foram preparadas 20 amostras. As composições e

concentrações das soluções biomiméticas utilizadas nesse estudo foram reproduzidas de acordo com o método de Kokubo (1996) modificado por Aparecida (2006) (Tabela 4).

Figura 21 - Amostras imersas em SBF, acondicionadas em estufa a 37°C.

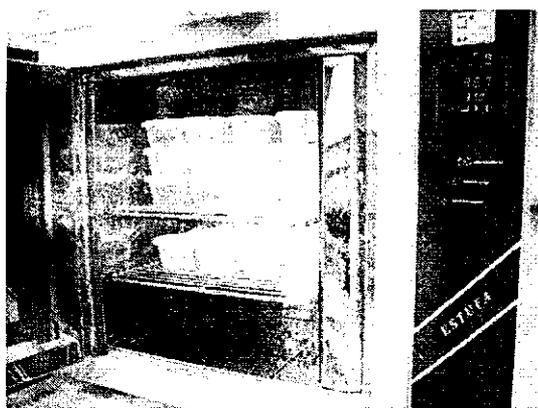


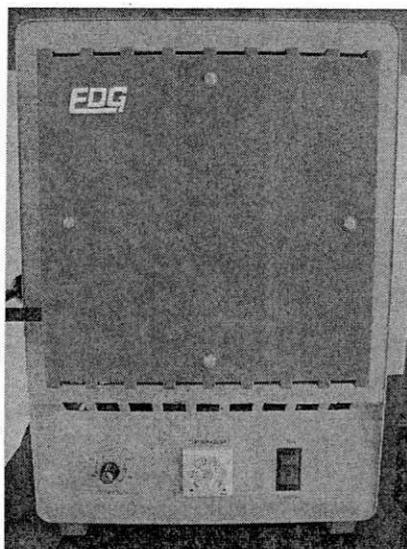
Tabela 4: Concentrações iônicas das soluções SBF utilizadas ($\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}	HCO_3^-
SBF 0	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	1,0	0,5	4,2
SBF 6	140,4	-	-	3,1	142,9	1,86	-	5,0

4.2.6 Tratamento térmico

Posterior à deposição, todas as amostras foram tratadas termicamente a 800°C por 1 hora, com o objetivo de aumentar a cristalinidade das apatitas depositadas, através do crescimento dos cristais, densificar a camada dessa biocerâmica sobre o metal, bem como diminuir sua solubilidade em meio aquoso (ALMEIDA FILHO, 2008; APARECIDA, 2006). O forno utilizado foi da marca EDG Equipamentos (Figura 22) e a taxa de aquecimento aplicada foi de 10°C/ minuto.

Figura 22: Forno da marca EDG Equipamentos, utilizado para o tratamento térmico das amostras



As etapas compreendidas desde a obtenção das pastilhas até o preparo das amostras (tratamento de superfície e recobrimento por apatitas) para a realização dos experimentos foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Araraquara - São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Guastaldi.

4.3 Caracterização das Ligas de Nitinol

Após o preparo das amostras, as variáveis das três composições foram analisadas quanto à sua citotoxicidade, através de duas técnicas diferentes: o método baseado na capacidade que as células viáveis têm de poderem ser clivadas pelo anel tetrazólico presente no M.T.T. (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)- 2,5-difeniltetrazólio) e o método que afere a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos cultivados no meio biológico. Os ensaios imunológicos foram realizados no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, sob orientação da Prof. Dra. Iracilda Zeppone Carlos. Como resultado, tem-se os

índices de viabilidade celular e de produção de óxido nítrico pelos macrófagos em contato com as diferentes amostras.

A morfologia da superfície das amostras foi analisada por Microscopia Óptica (MO), enquanto que o potencial de molhabilidade foi avaliado pelo Teste de Tensão Superficial, que afere o ângulo formado entre uma gota de água e a superfície em contato, de forma a analisar a hidrofiliabilidade do material.

Associado aos ensaios já citados foi realizado o teste de Bioatividade, cujo objetivo foi mimetizar o ambiente onde o biomaterial será aplicado, de maneira, a saber, como ele se comportará quando sujeito aos íons, sais, ácidos e bases presentes nos fluidos corpóreos. Para tanto, esse teste foi realizado através da imersão das amostras em SBF-0 1M por 7 dias, com trocas em 24, 48 e 48 horas. Para quantificação dos resultados, as amostras foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX), Difração de Raios-X (DRX) e pesagem da amostra antes e após a imersão em SBF, com o intuito de avaliar o comportamento do biomaterial antes e após o contato com o fluido que mimetiza o meio biológico.

4.3.1 Ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT

Nesse estudo, o método utilizado para avaliação *in vitro* da viabilidade celular de biomateriais foi o baseado no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio). Esse método fundamenta-se na capacidade que as células viáveis têm de clivar o anel tetrazólico presente no MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazan. Esses cristais acumulam-se no interior da célula e, após sua ruptura, são liberados para o exterior celular, intensificando a cor azul do meio. A concentração de formazan produzido é avaliada através da absorvância e apenas as células viáveis são capazes de metabolizar o MTT. O MTT convertido em formazan é solubilizado e pode ser lido por espectrofotometria em função desta conversão, podendo ser expresso em porcentagem de células vivas, ou seja, o percentual de viabilidade celular. Os resultados foram lidos em placas de cultivo em um leitor de Elisa, exibindo um elevado grau de precisão.

4.3.1.1 Esterilização do biomaterial para o ensaio de citotoxicidade

Inicialmente, todas as amostras das ligas de Nitinol que seriam utilizadas para o ensaio foram submetidas à esterilização em autoclave a 121°C por 30 minutos, para eliminação de qualquer microrganismo que pudesse interferir nos resultados. Durante os experimentos, o filtro Ultra-violeta acoplado à capela permaneceu ligado, para evitar a contaminação por agentes presentes no ambiente do laboratório.

4.3.1.2 Obtenção das células do exsudato peritoneal

Para o ensaio, foram utilizados camundongos machos da espécie Swiss (Figura 23), procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em São Paulo. Os animais foram mantidos em estufa (Figura 24) com controle de humidade e temperatura, alimentados regularmente com ração e água e conservados com o auxílio de métodos assépticos, evitando exposição a agentes agressores que pudessem interferir nos resultados finais.

Figura 23: Camundongos machos da espécie Swiss

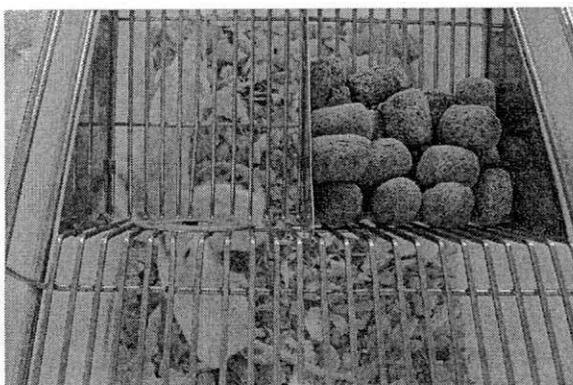


Figura 24: Estufa com controle de umidade e temperatura



Os camundongos foram estimulados previamente através da inoculação, via intraperitoneal (Figura 25), de 3 ml de solução de tioglicolato de sódio a 3% (Difco Lab. Ltda). Após o terceiro dia de exposição ao agente irritante, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, dando-se prosseguimento ao ensaio propriamente dito.

Figura 25: Inoculação de tioglicolato de sódio a 3%

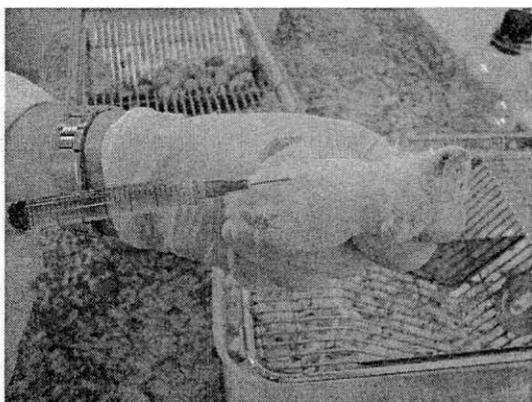


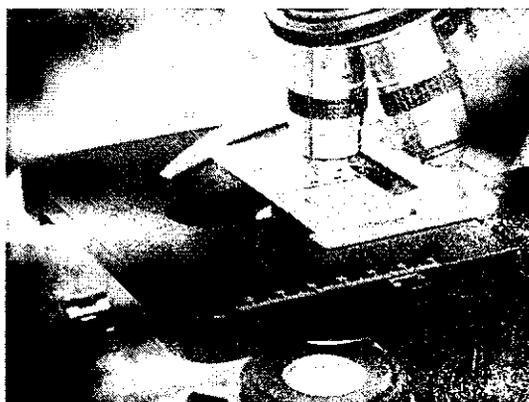
Figura 26: Injeção de solução salina tamponada de fosfatos em camundongo imobilizado



Os animais foram levados, um a um, para o interior da câmara de fluxo laminar (marca Veco) e imobilizados em um suporte (cama para animais) (Figura 26) pelas patas e em decúbito dorsal. A pele da região abdominal foi molhada com álcool 70%, tanto como medida antisséptica quanto para evitar a soltura de pelos durante a coleta do material. Em seguida, a pele do abdômen foi removida com o auxílio de pinças dente de rato, tomando-se cuidado para conservar o peritônio intacto. Com o peritônio exposto, injetou-se 5 ml de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) – estéril, pH 7.2, a 4°C – com auxílio de seringas e agulhas descartáveis (Figura 26). Todo o abdômen do animal recebeu massagem manual vigorosa, para a liberação de macrófagos aderidos aos tecidos, e o líquido abdominal foi coletado e mantido em banho de gelo, para preparo da suspensão celular. As células coletadas foram lavadas três vezes, na intenção de eliminar possíveis hemácias existentes, em 5 ml de PBS, com pH 7.2 e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C, em uma centrífuga refrigerada modelo Universal 32R,

marca Hettich Zentrifugen. Após as centrifugações, as células sedimentadas foram suspensas em 1ml de meio de cultura RPMI-1640 completo (Sigma). Para padronização do número de células a serem utilizadas em cada experimento, foi realizada a contagem de macrófagos com o auxílio de uma câmara hemocitométrica de Neubauer (marca Boeco) (Figura 27). Sendo assim, 10 μ l da suspensão em RPMI foram diluídos em 90 μ l de PBS e, desta solução, 10 μ l foram adicionados a 90 μ l do corante Líquido de Lázarus obtido através da mistura de Solução de Violeta (marca Synth), ácido acético glacial (marca Synth) e água deionizada, na proporção de 0,02g / 3ml / 100ml, respectivamente. As células foram contadas com o auxílio de microscópio óptico (marca Opton) (Figura 27), sendo ajustadas à concentração de 5 x 10⁶ células/ cm³ em meio RPMI-1640 completo.

Figura 27: Microscópio óptico com câmara de Neubauer

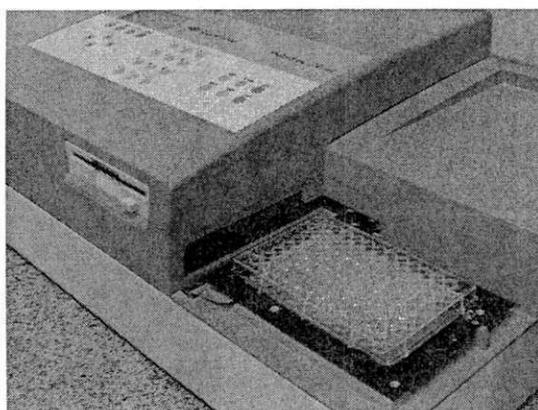


4.3.1.3 Avaliação da viabilidade celular

Em uma placa de cultura de células estéril com 96 poços de fundo plano (marca Corning Inc.), foi adicionado 1,0ml da suspensão celular e incubada a 37°C por 1 hora em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (marca Forma Scientific). Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas e aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640 completo em presença das amostras, e em poços isolados da mesma

placa de cultura de células, com as mesmas condições anteriores, foram adicionados 100µl de uma solução de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano de *Escherichia coli* da marca Sigma) como controle positivo e meio de cultura RPMI-1640 completo como controle negativo. A placa seguiu novamente para a estufa com tensão constante de 5% de CO₂ a 37°C e permaneceu incubada por 24 horas. As células aderentes foram tratadas com 100µl de uma solução de MTT (marca Across Organics) a 1 mg / ml em RPMI-1640. A placa foi incubada por 3 horas em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ a 37°C. Após a incubação, os sobrenadantes foram descartados, as amostras retiradas e o tapete celular tratado com 100µl de isopropanol (marca Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade óptica foi determinada em Leitor de Elisa (marca Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech) (Figura 28) em UV / visível, a 540nm, com filtro de referência de 620nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando o controle negativo como 100% de viabilidade.

Figura 28: Leitor de Elisa com placa de cultura de células



4.3.1.4 Determinação da produção de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é encontrado desempenhando uma importante função como sinalização molecular em muitas partes do organismo, bem como sendo uma importante molécula citotóxica de resposta imune inata (KRÖNCKE *et al.*, 1997).

Sua ação perpassa pela função hemostática, incluindo vasodilatação, neurotransmissão, inibição da adesão e da agregação plaquetária pela ação de defesa contra agentes infecciosos como bactérias, fungos e parasitas, agindo também como destruidor de células tumorais. Muitas células imunes são capazes de produzir NO, incluindo macrófagos (WEINBERG *et al.*, 1995).

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura celular através da reação de diazotação com reagente de Griess (composto por 1g de sulfanamida, 0,1g de dicloro N(1-naftil) etilenodiamina, 2,5ml de ácido ortofosfórico e água deionizada).

Para determinação da produção de óxido nítrico as condições foram as mesmas utilizadas para viabilidade celular. A diferença é que, após a incubação da placa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas, alíquotas de 50µL dos sobrenadantes das culturas celulares do exsudato peritoneal foram transferidas para uma placa de cultura de células com 96 poços e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada em UV / visível com filtro de 540nm em Leitor de Elisa. As concentrações do NO liberado no sobrenadante das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio e os valores expressos em µmol de nitrito / 5x10⁶ células.

4.3.1.5 Comitê de Ética em Pesquisa

Todos os procedimentos que utilizaram células vivas foram submetidos, conforme normas da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório), ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pertencente à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Araraquara (parecer nº08/2009 CEP/FCF/CAr), obtendo parecer favorável.

4.3.1.6 Análise Estatística dos Dados

As análises estatísticas para os resultados de viabilidade celular e determinação da produção de óxido nítrico foram feitas utilizando o teste estatístico ANOVA com comparações pelo método Tukey, considerando estatisticamente significativo valor de $p < 0,05$. A verificação da hipótese de igualdade foi realizada através do teste F de Levene e a verificação da hipótese de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Como programas auxiliares, utilizou-se o GraphPadInstat 3.0 e o Microsoft Excel.

4.4 Tensão Superficial (Molhabilidade)

A molhabilidade é a medida da afinidade de um líquido por um sólido, mensurada a partir do espalhamento de uma gota na superfície do material alvo da pesquisa (Figura 30). O líquido padrão para tal ensaio é a água, havendo a possibilidade de emprego de outro líquido de acordo com a necessidade do teste. A afinidade é identificada através do formato da gota quando em contato com a superfície, sendo o material classificado como hidrofílico quando o ângulo de contato é inferior a 90° e hidrofóbico quando o ângulo de contato excede 90° . Para a realização do ensaio, utilizou-se equipamento próprio para esse fim (Figura 29), pertencente ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO.

Figura 29: Equipamento utilizado para o ensaio de molhabilidade

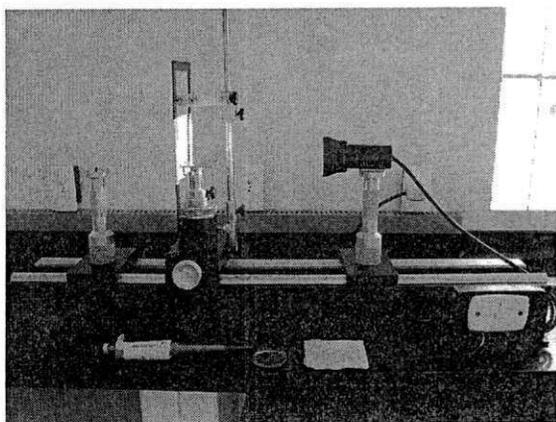
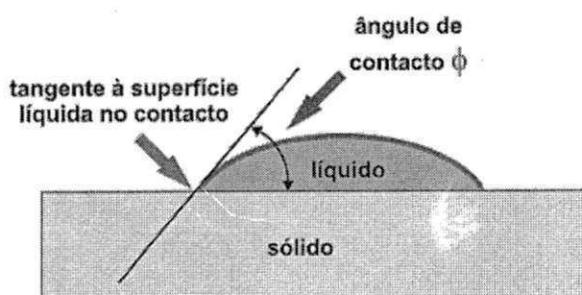


Figura 30: Observação do ângulo de contato formado entre um sólido e um líquido



FONTE: <http://www.google.com.br>

O grau de molhamento depende da energia de superfície relativa dos sólidos e dos líquidos e de sua atração intermolecular. Sólidos com alta energia e líquidos com baixa energia favorecem o bom molhamento; portanto, líquidos geralmente molham bem os sólidos com alta energia. Por outro lado, os líquidos formam gotas em sólidos com baixa energia. Analisando por outra perspectiva, para que um líquido molhe um sólido, eles necessitam de tensões superficiais similares, sendo elas baixas ou altas. O elevado ângulo de contato da água sobre estes sólidos pode ser diminuído com a adição de um agente umectante na água ou tratamentos superficiais nos sólidos, diminuindo a tensão superficial ou a energia de superfície (CRAIG *et al.*, 2002).

Para o ensaio de molhabilidade foi utilizado o programa Angle Calculator 1.0. Cada experimento foi mensurado cinco vezes para a obtenção da média aritmética e alcance de um ângulo mais fidedigno, que foi adotado como sendo o ângulo entre a amostra e a gota de água.

4.5 Microscopia Óptica

A microscopia óptica é utilizada na metalurgia, possibilitando análises microestruturais de metais e ligas metálicas em geral servindo como ponto de referência para a microscopia eletrônica (APARECIDA, 2006).

Para a análise morfológica superficial das amostras, utilizou-se um Microscópio Óptico da marca Hirox, modelo SHX-13M, pertencente ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO. As imagens foram obtidas com aumentos de 350x, 1050x e 2100x, porém só estão expostas neste trabalho as imagens com o aumento de 1050x, uma vez que as estruturas analisadas podem ser visualizadas com maior clareza no aumento selecionado.

4.6 Ensaio de Bioatividade

O ensaio de Bioatividade compreende um conjunto de testes que, analisados de forma simultânea e interligada, traduz o comportamento de um biomaterial quando em contato com o meio biológico, através da mimetização dos fluidos

corpóreos por SBF (Simulated Body Fluid). As análises envolvem: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX), Difração de Raios-X (DRX) e pesagem das amostras, sendo todos os procedimentos realizados antes e após a imersão em SBF. Neste ensaio, utilizou-se a SBF proposta inicialmente por Kokubo (1996), na concentração de 1M, com trocas em 24, 48 e 48 horas, com o objetivo de manter a saturação dos componentes da solução.

4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi utilizado nesta pesquisa um equipamento de bancada modelo TM-1000 (Figura 31) da Marca Hitachi, com aumento máximo de 20000x, profundidade focal de 1mm, resolução de 30nm e energia fixa de 15kV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa). A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura permite observar e caracterizar diferentes tipos de materiais, a partir da emissão e interação de feixes de elétrons sobre uma amostra, sendo possível caracterizá-los do ponto de vista de sua morfologia e sua organização ultraestrutural.

Figura 31: MEV modelo TM-1000 da marca Hitachi



4.6.2 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

O EDX é um ensaio utilizado para o conhecimento dos elementos químicos que compõem o biomaterial em questão. Através desta técnica pode-se fazer uma micro análise não-destrutiva e semi-quantitativa podendo determinar quantidades de até 1-2% dos elementos presentes na amostra

através da emissão de espectro de Raios X que a percorre, de forma pontual ou em área mais abrangente, fornecendo a informação requerida. Nesta pesquisa, foi utilizado um aparelho de EDX acoplado ao MEV, com as mesmas especificações já mencionadas.

4.6.3 Difração de Raios-X (DRX)

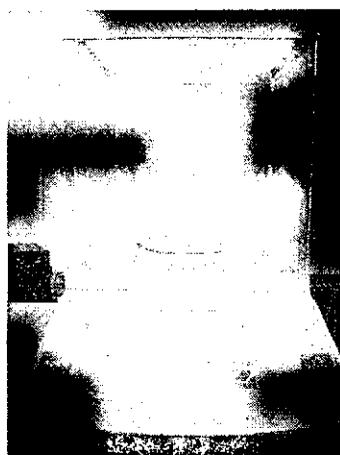
As análises por difração de raios X foram realizadas através de um difratômetro de raios X Shimadzu (modelo XRD 6000). A varredura foi realizada na região de 5° a 80° , sistema θ - 2θ , com radiação monocromática de cobre, na velocidade de 2° min^{-1} , voltagem de 40 KV e corrente de 30 mA.

Para identificação das fases foi utilizado o programa Pmgr da Shimadzu e para obtenção das fichas cristalográficas padrão foi acessado o banco de dados JCPDS (Internacional Center for Diffraction Data).

4.6.4 Pesagem das amostras

Todas as amostras das três composições com os diversos tratamentos superficiais foram pesadas antes e após o ensaio da bioatividade. Para tanto, foi utilizada uma balança eletrônica de precisão da marca OhausAdventurer, modelo AR2140 (Figura 32). A partir dos valores observados, calculou-se a média dos pesos encontrados, o qual foi tomado como parâmetro para as devidas comparações.

Figura 32: Balança eletrônica de precisão da marca OhausAdventurer.

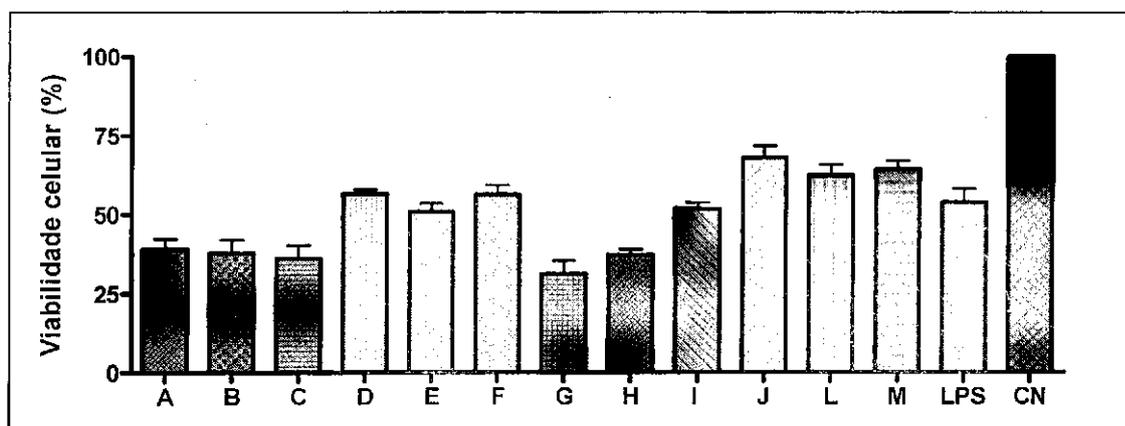


5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da Viabilidade Celular dos Macrófagos

Este teste foi realizado no intuito de avaliar a viabilidade das células na presença das ligas produzidas. A figura 33 refere-se aos percentuais de viabilidade celular dos macrófagos quando em presença das ligas de Nitinol em suas diferentes composições, associadas ou não a tratamentos superficiais, conforme gráfico demonstrativo da figura 12.

Figura 33 - Gráfico referente à viabilidade celular de macrófagos quando em contato com as diferentes ligas de Nitinol



Como medida didática e facilitadora de leitura, as ligas foram denominadas utilizando-se uma letra de A a M, entendidas conforme tabela abaixo:

Tabela 5 - Denominações referentes ao gráfico de viabilidade e seus significados

Liga de Nitinol	Denominação
Rica em Ni apenas com polimento	A
Rica em Ti apenas com polimento	B
Equiatômica apenas com polimento	C
Equiatômica com aplicação de laser	D

Rica em Ni com aplicação de laser	E
Rica em Ti com aplicação de laser	F
Equiatômica com aplicação de laser e deposição de SBF-0	G
Equiatômica com aplicação de laser e deposição de SBF-6	H
Rica em Ni com aplicação de laser e deposição de SBF-0	I
Rica em Ni com aplicação de laser e deposição de SBF-6	J
Rica em Ti com aplicação de laser e deposição de SBF-0	L
Rica em Ti com aplicação de laser e deposição de SBF-6	M

De acordo com os dados acima, as células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade celular. Tanto o controle positivo quanto o negativo são utilizados como parâmetros de eficácia do ensaio de citotoxicidade.

Para que um biomaterial seja viável para utilização em organismos vivos, ele deve apresentar um mínimo de 50% de viabilidade celular quando da realização de testes *in vitro* com esta finalidade de verificação. Como pode-se observar na figura 33, cinco tipos de amostras não obtiveram o mínimo desejado de viabilidade celular, sendo elas: as três composições da liga apenas com polimento (A- rica em Ni, B- rica em Ti e C- Equiatômica) e as ligas equiatômicas com aplicação de laser conjuntamente à deposição de apatitas, tanto por SBF-0 quanto SBF-6, amostras G e H, respectivamente. Particularmente no caso das duas últimas variáveis que obtiveram viabilidade celular inferior a 50%, uma investigação mais detalhada deve receber atenção em um segundo momento, visto que a mesma composição com aplicação unicamente de laser em sua superfície não foi considerada citotóxica e a hidroxiapatita é uma cerâmica muito bem aceita pelo organismo.

Em todas as demais variáveis foi observada viabilidade celular superior a 50 %. Na Tabela 06 estão relacionados a média e o desvio-padrão dos valores de células viáveis em presença das amostras estudadas, e para os controles positivo e negativo.

Tabela 06: Médias e desvio-padrão dos valores de células viáveis em presença das ligas em suas variadas composições e modificações superficiais, e para os controles positivo e negativo.

VIABILIDADE CELULAR		
Testes / Amostras	Média	Desvio-padrão
Amostra A	39,10	8,287
Amostra B	37,80	10,430
Amostra C	36,15	9,857
Amostra D	56,43	3,517
Amostra E	50,90	6,379
Amostra F	56,32	7,052
Amostra G	31,19	10,160
Amostra H	37,20	4,520
Amostra I	51,69	5,201
Amostra J	67,89	9,108
Amostra L	62,20	8,690
Amostra M	64,16	6,777
LPS (Controle Positivo)	53,90	10,290
Controle Negativo	100,0	0,0

Os resultados obtidos para as amostras D e F, correspondentes às ligas com aplicação de laser, e para as amostras J, L e M, correspondentes àquelas Ricas em Ni com aplicação de laser e deposição de SBF-6, e Ricas em Ti com aplicação de laser e deposição de SBF-0 e SBF-6, respectivamente, demonstraram a efetividade das modificações superficiais aplicadas ao material, com viabilidade superior a 56 %. As amostras de composições equivalentes C e D, B e F, quando comparadas, apresentam um aumento de aproximadamente 20 % de viabilidade celular para as ligas modificadas. No caso das amostras A e J, e B, L e M, também com composições equivalentes, observa-se um aumento de aproximadamente 25 % na viabilidade celular. Esses dados, porém, devem ser avaliados concomitantemente às taxas de produção de óxido nítrico pelas células sobreviventes, que indicarão se estas reagiram em proporções aceitáveis ou não pelo sistema imune.

5.1.1 Determinação da Produção de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos a partir da exposição às ligas testadas situou-se em 20 $\mu\text{mols/mL}$ para sete tipos de amostras, que são considerados valores positivos. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 34 e estão relacionados com os respectivos desvios-padrões na Tabela 08.

Figura 34: Gráfico referente à produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos Swiss quando em contato com as diferentes ligas de Nitinol

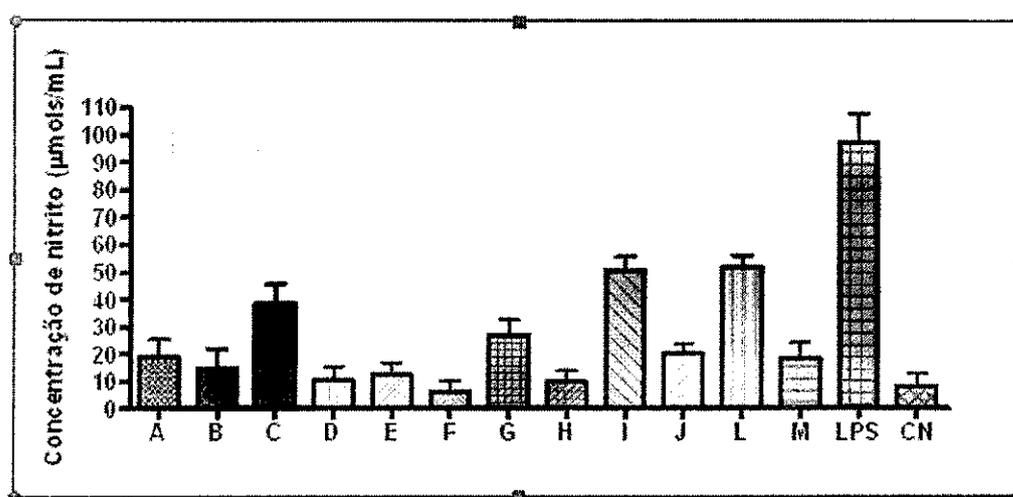


Tabela 07 - Denominações referentes ao gráfico de produção de óxido nítrico e seus significados

Liga de Nitinol	Denominação
Rica em Ni apenas com polimento	A
Rica em Ti apenas com polimento	B
Equiatômica apenas com polimento	C
Equiatômica com aplicação de laser	D
Rica em Ni com aplicação de laser	E
Rica em Ti com aplicação de laser	F
Equiatômica com aplicação de laser e deposição de SBF-0	G

deposição de SBF-0	
Equiatômica com aplicação de laser e deposição de SBF-6	H
Rica em Ni com aplicação de laser e deposição de SBF-0	I
Rica em Ni com aplicação de laser e deposição de SBF-6	J
Rica em Ti com aplicação de laser e deposição de SBF-0	L
Rica em Ti com aplicação de laser e deposição de SBF-6	M

Tabela 08: Médias e desvio-padrão dos valores de células viáveis em presença das ligas em suas variadas composições e modificações superficiais, e para os controles positivo e negativo.

ÓXIDO NÍTRICO			
Amostras	Células Viáveis (%)	Média ($\mu\text{mols/mL}$)	Desvio-padrão
Amostra A	39,10	18,71	16,63
Amostra B	37,80	14,65	17,29
Amostra C	36,15	38,27	18,44
Amostra D	56,43	10,40	12,52
Amostra E	50,90	12,70	10,15
Amostra F	56,32	6,23	10,16
Amostra G	31,19	26,87	13,94
Amostra H	37,20	9,74	10,15
Amostra I	51,69	50,45	12,71
Amostra J	67,89	20,15	9,54
Amostra L	62,20	51,69	10,60
Amostra M	64,16	18,58	13,86
LPS (Controle Positivo)	53,90	97,20	25,94
Controle Negativo	100,0	8,28	11,20

Os resultados indicam que para as Amostras A, B e C, as células que continuaram vivas (39,10 %, 37,80 % e 36,15 %) reagiram liberando uma média de concentração de 18,71, 14,65 e 38,27 $\mu\text{mols/mL}$, respectivamente. Da mesma

forma, as células sobreviventes para as demais amostras, D a M, regiram liberando a média de concentração de óxido nítrico indicada na Tabela 08.

De acordo com esses resultados, as células vivas restantes para as amostras C, G, I, J e L reagiram à presença do material, indicando toxicidade, enquanto as células vivas para as amostras A, B, D, E, F, H e M demonstraram liberação reduzida de óxido nítrico, em taxas aceitáveis. Dentre estas últimas, as amostras D, F e M se destacam por apresentar maior porcentagem de células vivas com menor liberação de óxido nítrico.

Logo, ainda que as amostras J, L e M tenham ocasionado a sobrevivência de um número superior de células, a intensa resposta dessas à presença das ligas indica que as amostras D, E, F e M, obtidas através dos procedimentos estabelecidos por esta pesquisa, podem ser aplicadas sem que haja uma resposta indesejada dos tecidos celulares, o que possibilita o prosseguimento de ensaios para verificação de outras propriedades, visto a verificação da citotoxicidade ser condição *sinequa non* para aplicação em seres vivos.

5.2 Avaliação da Molhabilidade

As figuras 35, 36 e 37 ilustram o ensaio de molhabilidade das diferentes composições de acordo com os diversos tratamentos superficiais a que elas foram submetidas. O valor dos ângulos de contato podem ser observados nas respectivas tabelas (9, 10 e 11).

De acordo com as figuras 35 e 37, pode-se observar que as composições equiatômicae rica em níquel em seu estado bruto (apenas com polimento, sem modificações superficiais) apresenta hidroflicidade (57° e $52,5^\circ$, respectivamente), passando de uma superfície parcialmente molhante para uma não molhante ($120,5^\circ$ e 110° , respectivamente) após modificação pelo laser Ytterbium pulsado. Após a deposição de apatitas, tanto por SBF tipo 0 ($36,5^\circ$ e 24° , respectivamente) quanto por SBF tipo 6 (31° e 26° , respectivamente) a superfície volta a ser molhada de forma parcial, porém com maior espalhamento da gota, ou seja, com maior hidroflicidade.

Esse comportamento não é observado na composição rica em titânio (Figura 36), cujo ângulo obtido após modificação superficial pelo laser Ytterbium pulsado foi menor ($47,5^\circ$) que em estado bruto (49°). Após deposição de apatitas pelo método biomimético utilizando-se SBF-0, ele apresentou menor índice de molhabilidade (57°), em oposição ao observado quando a deposição de apatitas foi realizada por SBF-6 ($25,5^\circ$), resultando em um comportamento mais hidrofílico.

Figura 35: Ensaio de molhabilidade da composição Equiatômica apenas com polimento (a); com aplicação superficial de laser Ytterbium pulsado (b) e com deposição de apatitas pelo Método Biomimético utilizando SBF tipo 0 (c) e tipo 6 (d).

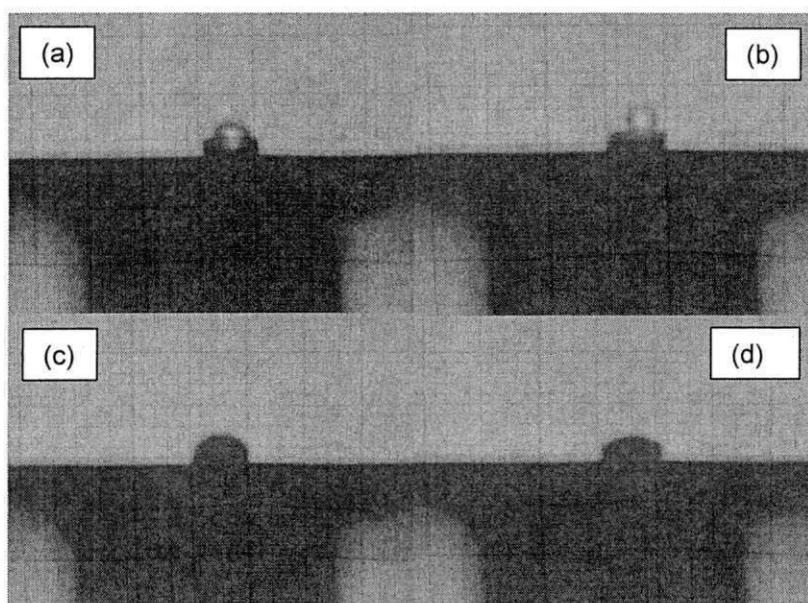


Tabela 9: Ângulos de contato encontrados no ensaio de molhabilidade para os diferentes tratamentos superficiais da composição equiatômica.

Liga Equiatômica	Ângulo de contato
Polimento (a)	57°
Laser (b)	$120,5^\circ$
SBF-0 (c)	$36,5^\circ$
SBF-6 (d)	31°

Figura 36: Ensaio de molhabilidade da composição rica em titânio apenas com polimento (a); com aplicação superficial de laser Ytterbium pulsado (b) e com deposição de apatitas pelo Método Biomimético utilizando SBF tipo 0 (c) e tipo 6 (d).

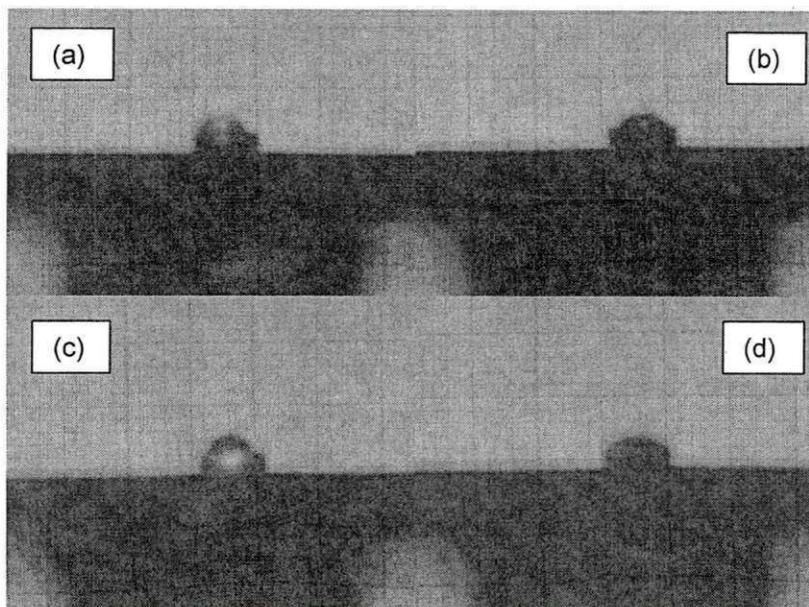


Tabela 10: Ângulos de contato encontrados no ensaio de molhabilidade para os diferentes tratamentos superficiais da composição rica em titânio.

Liga rica em Ti	Ângulo de contato
Polimento (a)	49°
Laser (b)	47,5°
SBF-0 (c)	57°
SBF-6 (d)	25,5°

Figura 37: Ensaio de molhabilidade da composição rica em níquel apenas com polimento (a); com aplicação superficial de laser Ytterbium pulsado (b) e com deposição de apatitas pelo Método Biomimético utilizando SBF tipo 0 (c) e tipo 6 (d).

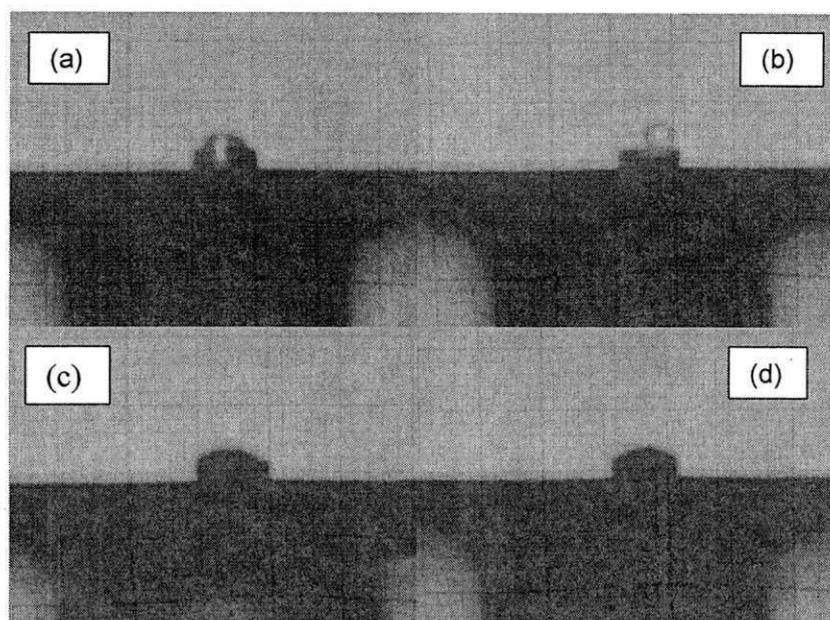


Tabela 11: Ângulos de contato encontrados no ensaio de molhabilidade para os diferentes tratamentos superficiais da composição rica em níquel.

Liga rica em Ni	Ângulo de contato
Polimento (a)	52,5°
Laser (b)	110°
SBF-0 (c)	24°
SBF-6 (d)	26°

Segundo LIMA (2011) e FOOK (2005), o ângulo de contato entre a gota de um líquido e uma superfície sólida vai depender da relação entre as forças adesivas, que fariam a gota espalhar-se sobre a superfície e as forças coesivas do líquido que contraem a gota na forma de uma esfera com superfície de contato mínima, sendo um parâmetro útil para prever a interação de um biomaterial com o meio biológico.

Sendo assim, o espalhamento da gota fica condicionado à energia de superfície da mesma comparada à energia de superfície do sólido. Quanto mais próximas, independente de serem altas ou baixas, menor é o ângulo de contato.

Outros métodos para induzir uma melhor molhabilidade são através da adição de um agente umectante na água ou de tratamentos superficiais nos sólidos, diminuindo a tensão superficial ou a energia de superfície.

Estudo realizado por CATÃO (2011), utilizando composições e tratamentos superficiais similares, apontou declínio do ângulo de contato nas três composições tratadas à laser, cujo ângulo variou entre $29,77^\circ$ e $33,51^\circ$, sendo um indicativo de hidrofiliabilidade. Em contrapartida, o presente estudo verificou que, em duas das três composições analisadas, o ângulo de contato obtido após a aplicação do laser variou entre 110° e $120,5^\circ$, indicando hidrofobicidade. Algumas possibilidades podem ser levantadas para justificar tal fato. A primeira delas é a existência, na presente pesquisa, da etapa de secagem das amostras em estufa a 60°C por 3 horas antes da realização do experimento, eliminando qualquer vestígio de umidade superficial nas amostras. Outro aspecto relevante é o tempo em que a amostra permaneceu armazenada para a realização dos ensaios.

5.3 Microscopia Óptica

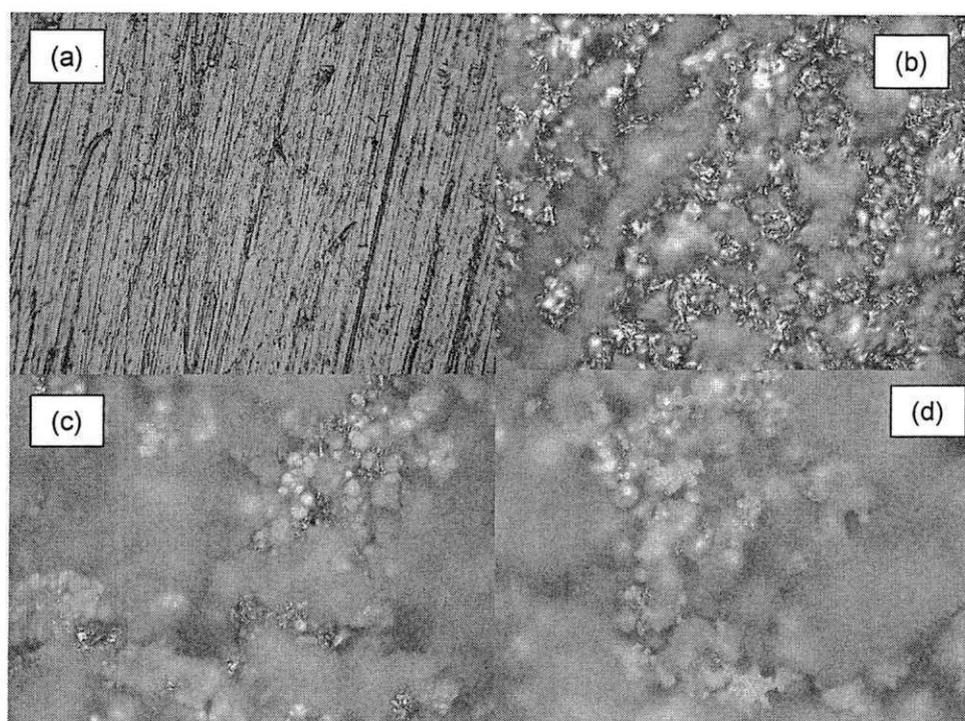
As figuras 38 a 40 apresentam as imagens obtidas a partir do ensaio de microscopia óptica das três composições e de suas variações de acordo com a modificação superficial realizada. O aumento utilizado neste estudo foi de 1050x.

As três composições com polimento apresentaram riscas superficiais, características do corte do cilindro para confecção da amostra e do método de polimento, além de pequenos pontos de oxidação, por tratar-se de um material metálico.

A irradiação superficial a laser transformou a superfície relativamente lisa em uma área com conglomerados esféricos e fendas relativamente uniformes, pelo processo de ablação, que consiste no rápido processo de fusão e solidificação do metal, promovendo transporte de massa e gerando um estado de instabilidade. Diante disso, a aplicação superficial a laser atendeu às expectativas, visto que tal

modificação foi utilizada para propiciar maior área superficial e rugosidade para o auxílio do embricamento mecânico e mais rápida osseointegração, além de propiciar propriedades físico-químicas mais adequadas para utilização em meio biológico do que a liga em seu estado polido.

Figura 38: Liga equiatômica polida (a), irradiada à laser (b), com deposição de SBF-0 (c) e SBF-6, analisada utilizando-se microscopia óptica.



As amostras com deposição de apatitas foram antes irradiadas com laser do tipo Ytterbium pulsado e tratadas quimicamente com hidróxido de sódio (NaOH), a fim de propiciar uma deposição mais satisfatória em virtude da ativação da superfície, através da formação de titanato de sódio, que reage melhor com as apatitas do que o Nitinol. Analisando-se as figuras 38-c-d, 39-c-d e 40-c-d pode-se perceber a formação de estruturas esbranquiçadas e arredondadas, característicos de grãos de apatitas. A deposição apresentou-se maior quando realizada através de SBF do tipo 6, embora com a SBF tipo 0 também tenha sido possível sua obtenção.

Mesmo empregando-se SBFs que favorecem a deposição de apatitas de interesse biológico, não se pode especificar o tipo de apatita depositada nas condições empregadas para este estudo. No entanto, pode-se afirmar a existência da formação de um filme biocerâmico.

Figura 39: Liga rica em níquel polida (a), irradiada à laser (b), com deposição de SBF-0 (c) e SBF-6, analisada utilizando-se microscopia óptica.

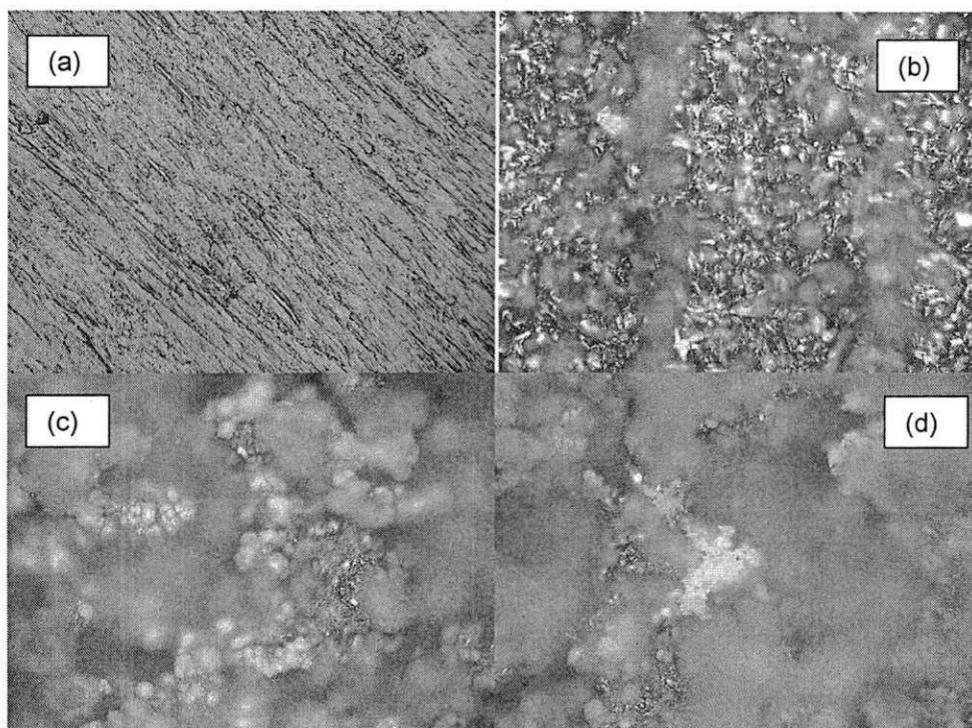
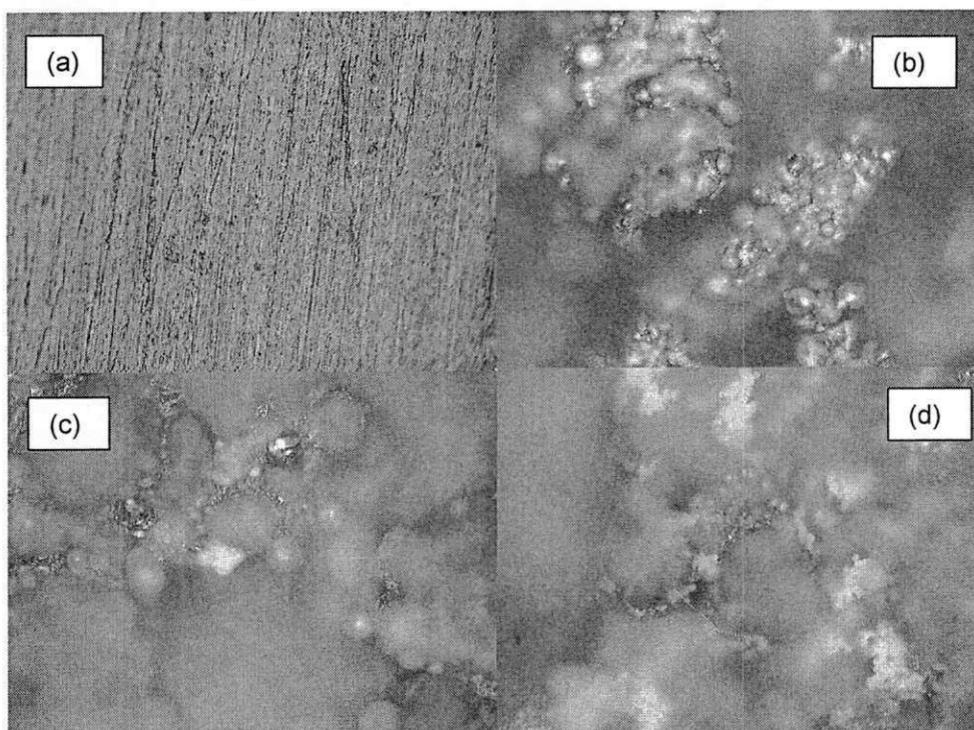


Figura 40: Liga rica em titânio polida (a), irradiada à laser (b), com deposição de SBF-0 (c) e SBF-6, analisada utilizando-se microscopia óptica.



5.4 Bioatividade

5.4.1 Pesagem das amostras

Todas as amostras envolvidas no ensaio de bioatividade foram pesadas antes e após a imersão em SBF, de forma a quantificar a variação em peso que cada uma delas apresentou. A partir da realização das aferições, procedeu-se a verificação da média aritmética dos ganhos, que foi tomada como parâmetro para as comparações. A tabela abaixo exhibe a média dos ganhos de cada variação.

Tabela 12: Média aritmética do ganho em peso de cada variável estudada.

Variável estudada	Média do ganho em peso (mg)
Liga rica em Ni apenas com polimento	0,25 mg
Liga rica em Ti apenas com polimento	0,75 mg
Liga Equiatômica apenas com polimento	0,75 mg
Liga Equiatômica com modificação por laser	0,75 mg
Liga rica em Ni com modificação por laser	0,50 mg
Liga rica em Ti com modificação por laser	1,25 mg
Liga Equiatômica com deposição de apatitas (SBF-0)	1,00 mg
Liga Equiatômica com deposição de apatitas (SBF-6)	1,25 mg
Liga rica em Ni com deposição de apatitas (SBF-0)	1,50 mg
Liga rica em Ni com deposição de apatitas (SBF-6)	0,75 mg
Liga rica em Ti com deposição de apatitas (SBF-0)	0,00 mg
Liga rica em Ti com deposição de apatitas (SBF-6)	1,00 mg

De acordo com a tabela 12, a liga rica em níquel com aplicação de laser conjuntamente à deposição de apatitas por SBF-0 foi a variável que apresentou maior ganho em peso durante o ensaio de bioatividade, pela deposição de apatitas em sua superfície. Em contrapartida, a liga rica em titânio com aplicação de laser

conjuntamente à deposição de apatitas por SBF-0 não possuiu modificação de peso em nenhuma das amostras analisadas. Todas as outras variáveis apresentaram ganho entre 0,25 mg a 1,25 mg.

5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

As figuras 41, 43 e 45 exibiram a morfologia das três composições polidas (equiatômica, rica em níquel e rica em titânio), analisadas em microscópio eletrônico de varredura, antes e após a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade. Abaixo encontra-se o resultado do EDX correspondente às imagens, para associação e melhor entendimento do comportamento do biomaterial quando em contato com meio biológico.

Figura 41: Liga equiatômica polida analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

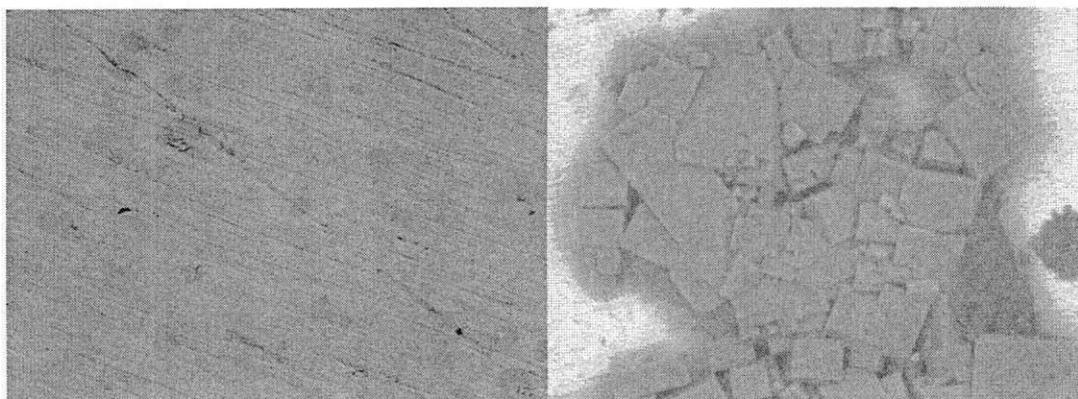


Figura 42: Elementos químicos presentes nas amostras equiatômicas polidas analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.

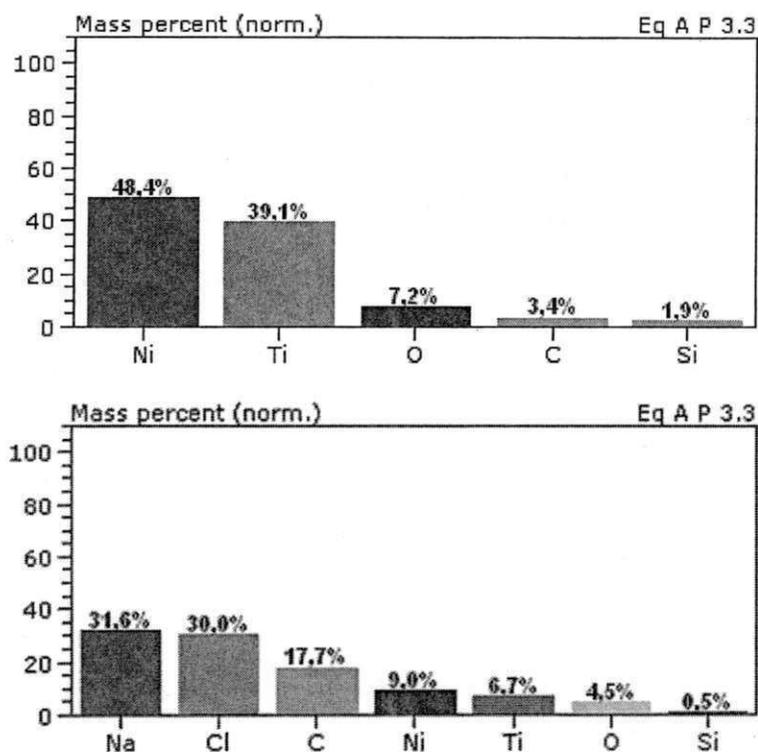


Figura 43: Liga rica em níquel polida analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

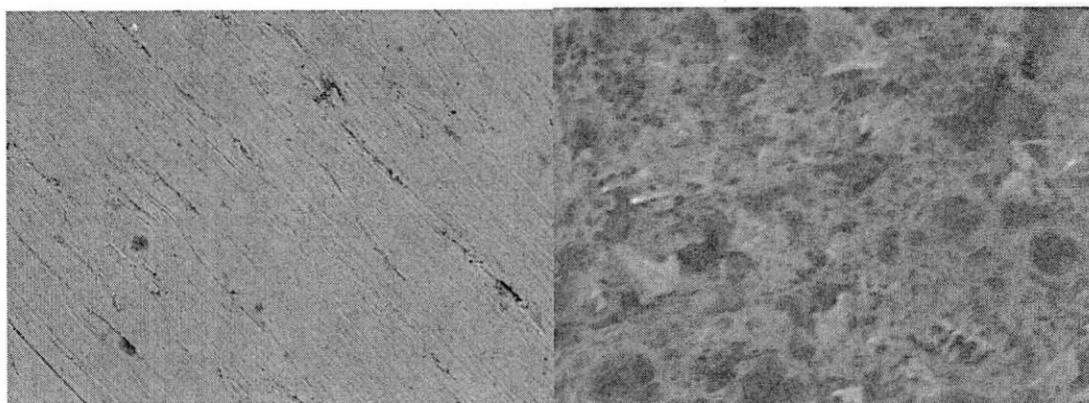


Figura 44: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em níquel polidas analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.

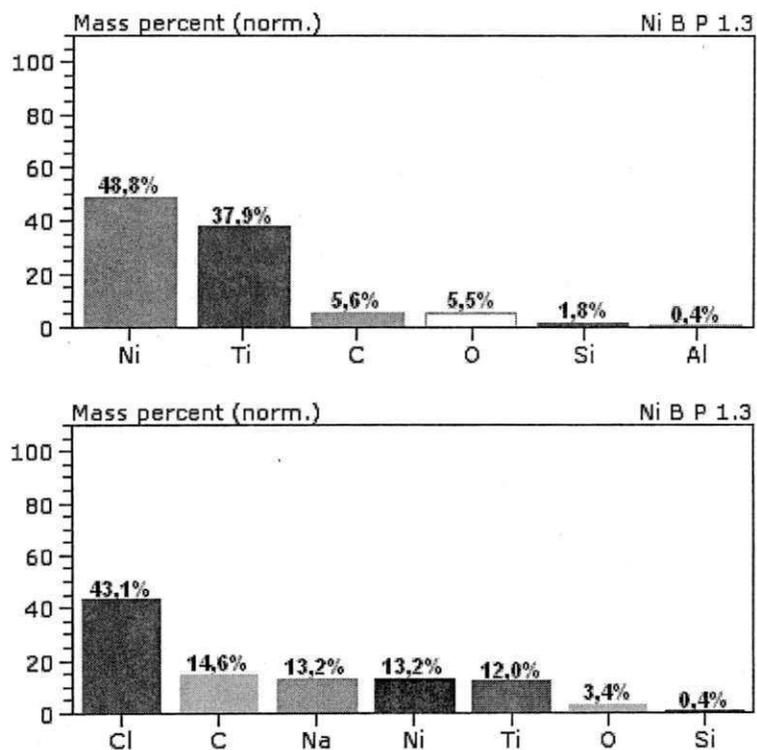


Figura 45: Liga rica em titânio polida analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

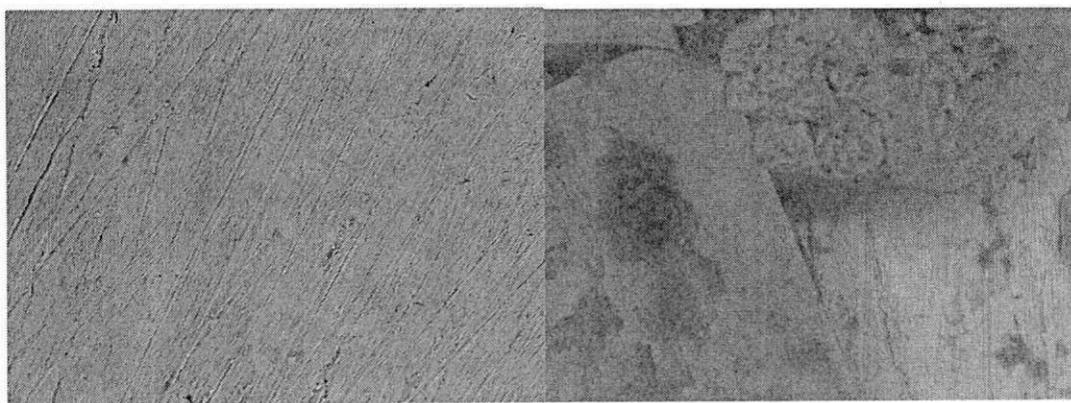
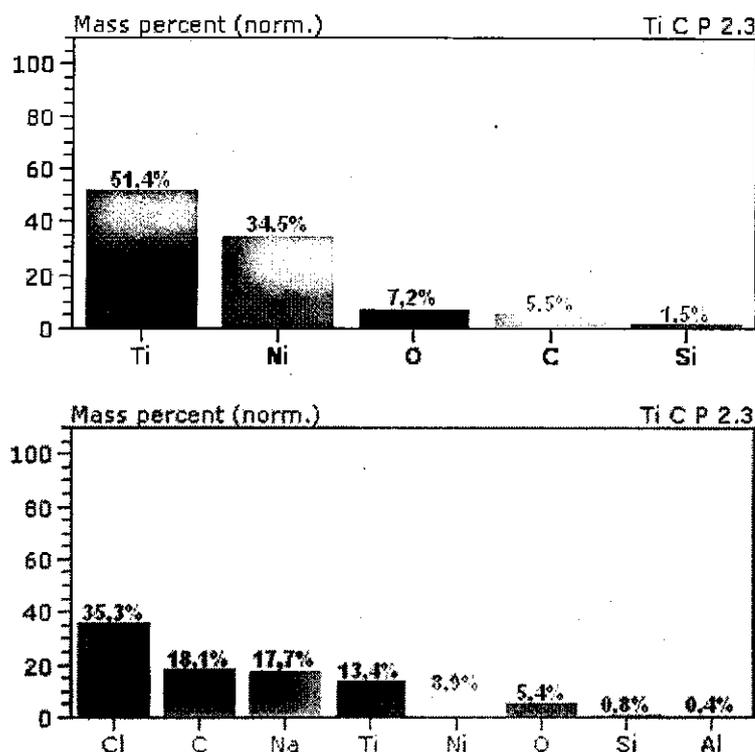


Figura 46: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em titânio polidas analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.



As imagens mostram, no primeiro momento, as superfícies das ligas polidas com riscas que são originárias do processo de corte e polimento. Na segunda tomada de imagens, após a imersão em SBF para o ensaio da bioatividade, pode-se perceber a deposição de cristais superficiais que, com o auxílio da espectroscopia por energia dispersiva de raios X, podem ser identificados. Comparando-se os resultados, pode-se constatar que, em todas as composições polidas houve deposição de sais de cloreto de sódio na superfície do biomaterial. Os percentuais de Silício (Si) e Alumínio (Al) podem ser considerados contaminantes. Em todas as análises constatou-se a presença de Níquel (Ni), Titânio (Ti), Carbono (C) e Oxigênio (O).

As figuras 47, 49 e 51, mostram a topografia das três composições modificadas superficialmente por laser e analisadas em microscópio eletrônico de varredura, antes e após a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade. Nas figuras 48, 50 e 52 encontram-se os resultados do EDX correspondentes às imagens.

Figura 47: Liga equiatômica modificada por laser analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.



Figura 48: Elementos químicos presentes nas amostras equiatômicas modificadas por laser analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.

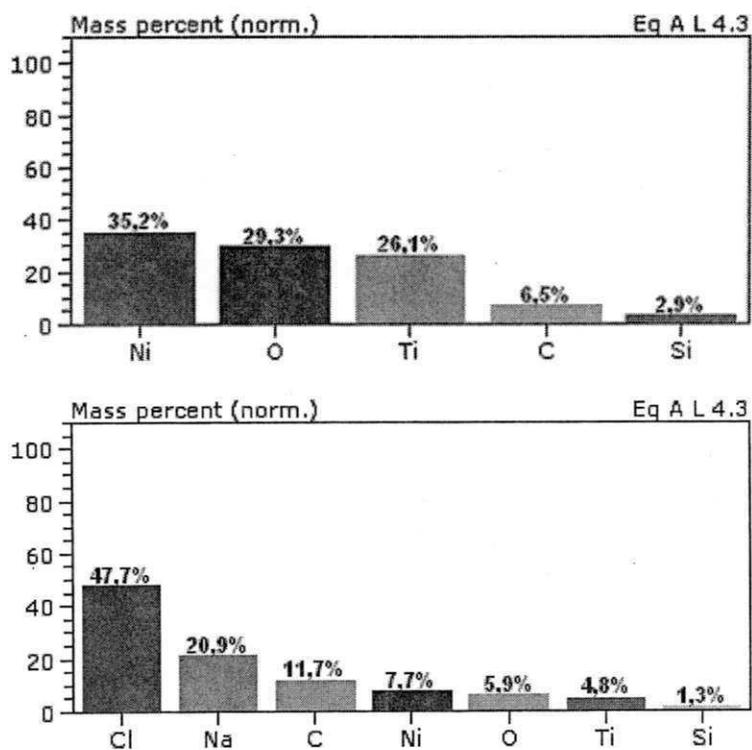


Figura 49: Liga rica em níquel modificada por laser analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

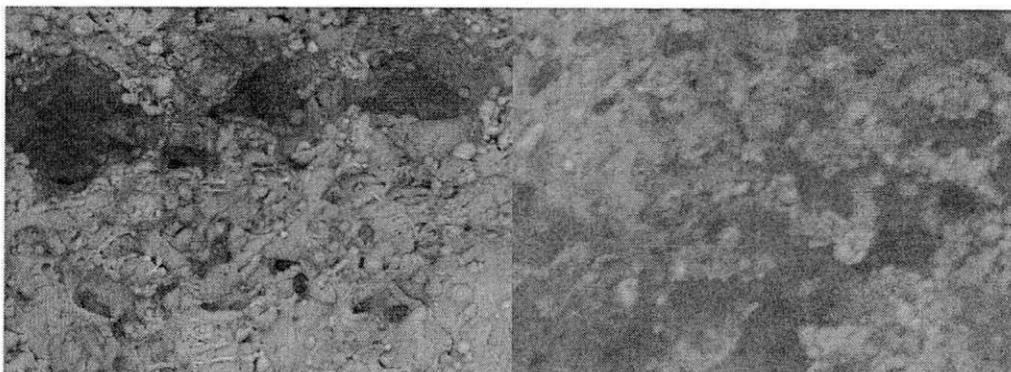


Figura 50: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em níquel modificadas por laser analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.

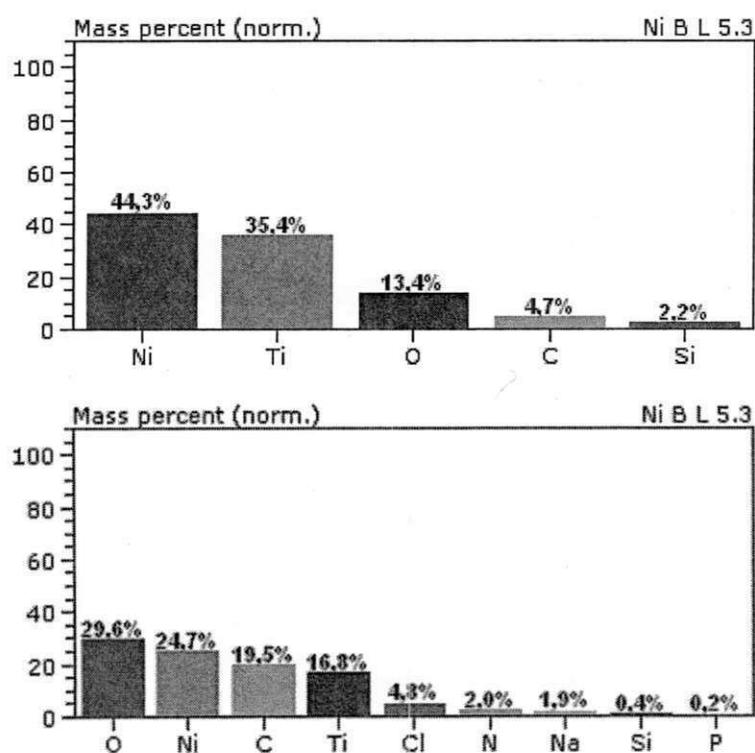


Figura 51: Liga rica em titânio modificada por laser analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

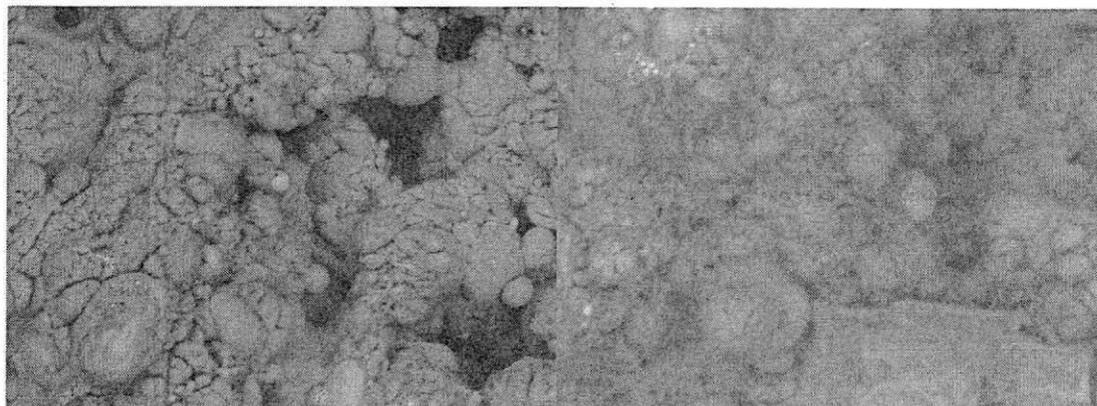
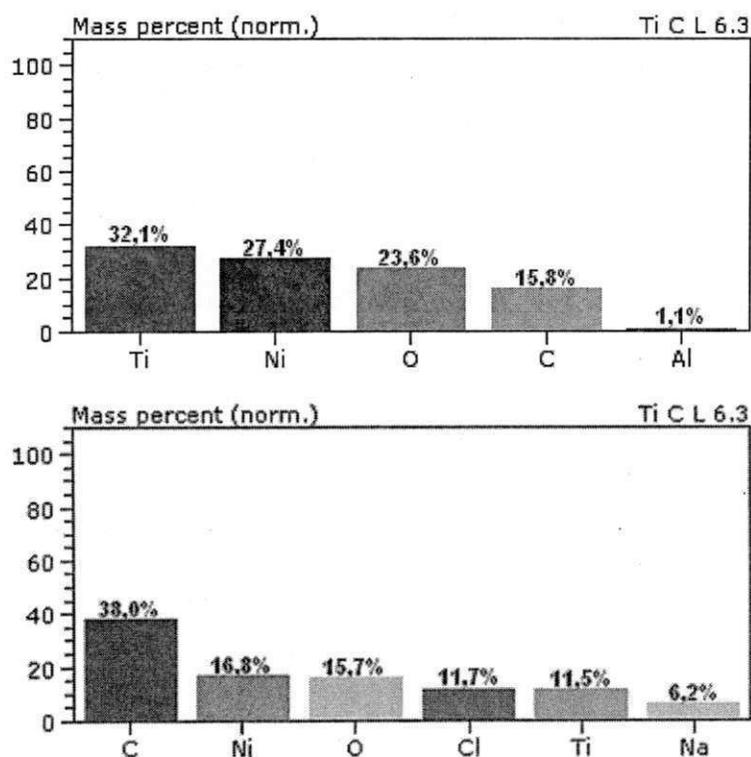


Figura 52: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em titânio modificadas por laser analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.



Nas imagens relativas às composições modificadas superficialmente por laser, notou-se a presença de aglomerados circulares e relativamente homogêneos em toda superfície das amostras, intercalados por fendas relativamente regulares. Essas estruturas são formadas devido à ablação provocada pela irradiação à laser, que promove rápida fusão e solidificação da superfície do material, havendo transporte de massa de uma região para outra e gerando uma um estado de menor estabilidade. Pode-se observar que o laser proporcionou um aumento da rugosidade e da área superficial da amostra, atingindo as expectativas, visto que essas características são desejáveis para um melhor embricamento mecânico entre implante e tecido ósseo.

Observando-se as estruturas depositadas e relacionando-as ao resultado do EDX, pode-se perceber a formação de cristais de cloreto de sódio na superfície das amostras. O EDX aponta a existência de outros compostos, além de Cloro (Cl) e Sódio (Na): há Titânio (Ti), Níquel (Ni), Carbono (C) e Oxigênio (O). A ocorrência de Alumínio (Al) e Silício (Si) pode ser considerado contaminante, em virtude do baixo índice de ocorrência.

As figuras 53, 55, 57, 59, 61 e 63 mostram a topografia das três composições modificadas superficialmente por laser conjuntamente à deposição de apatitas em sua superfície, tanto por SBF-6 quanto por SBF-0. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura, antes e após a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade. Nas figuras 54, 56, 58, 60, 62 e 64 encontram-se os resultados do EDX correspondentes às imagens.

Figura 53: Liga equiatômica modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

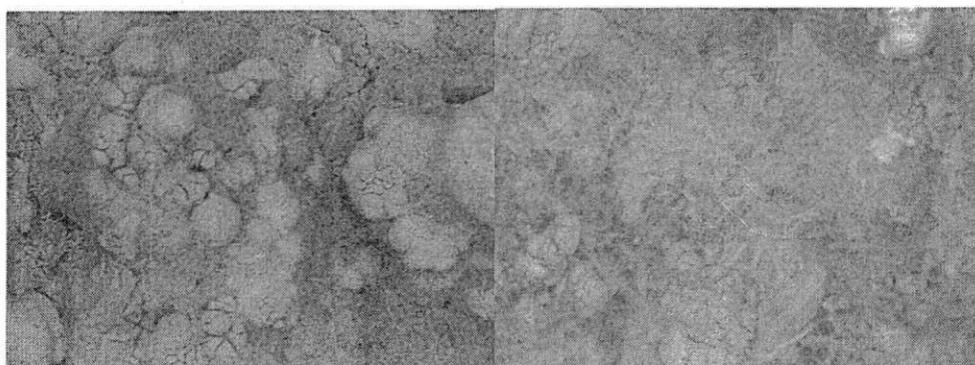


Figura 54: Elementos químicos presentes nas amostras equiatômicas modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.

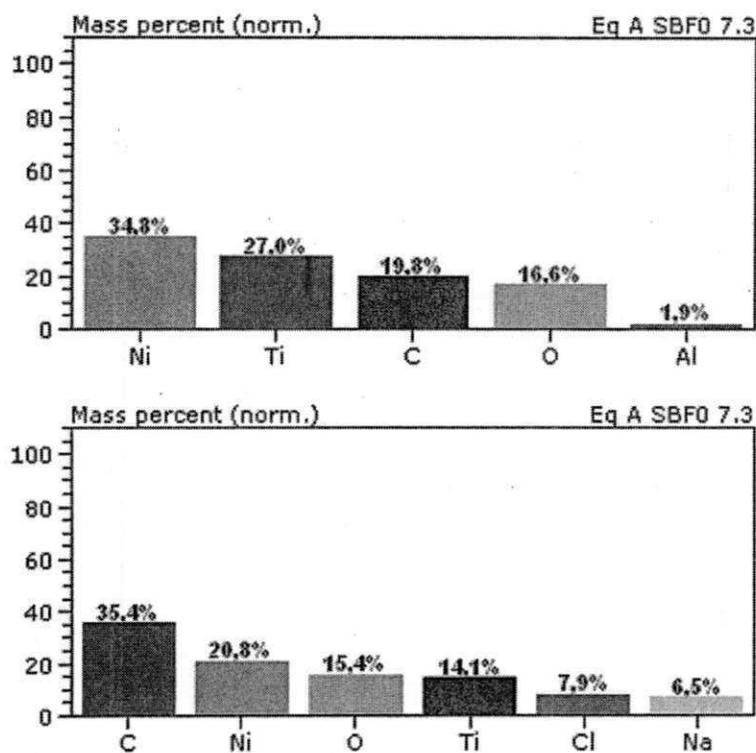


Figura 55: Liga equiatômica modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

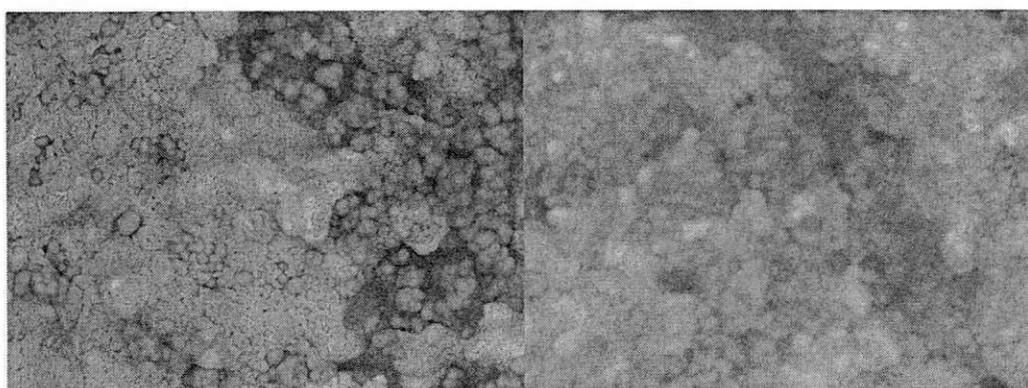


Figura 56: Elementos químicos presentes nas amostras equiatômicas modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.

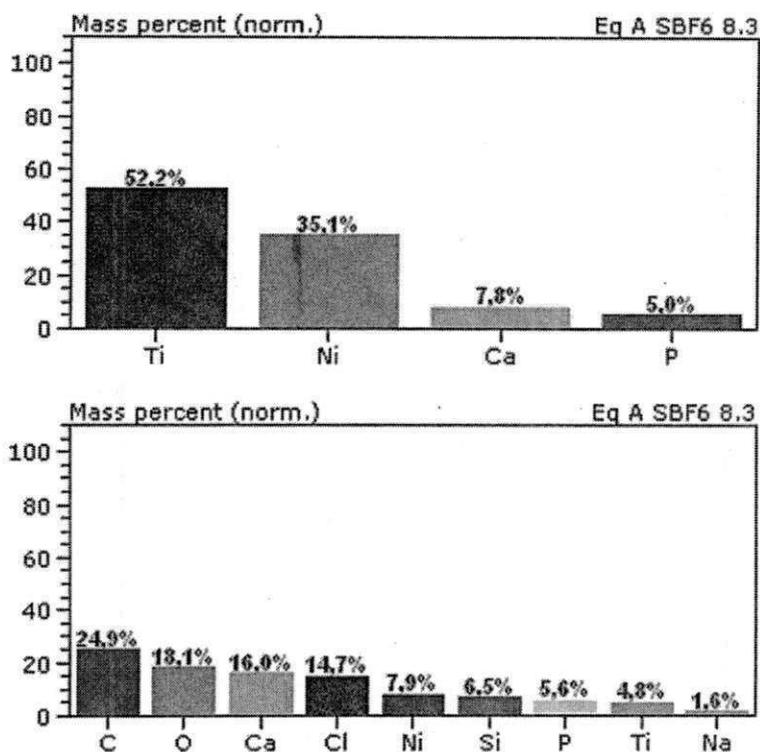


Figura 57: Liga rica em níquel modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

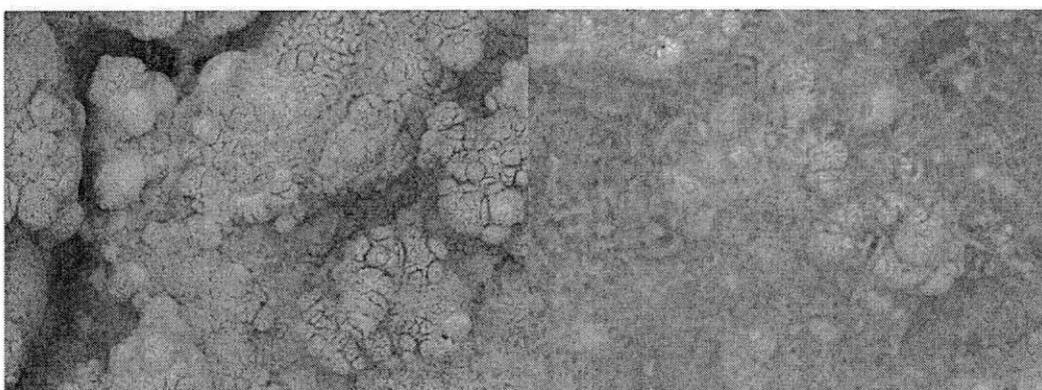


Figura 58: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em níquel modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.

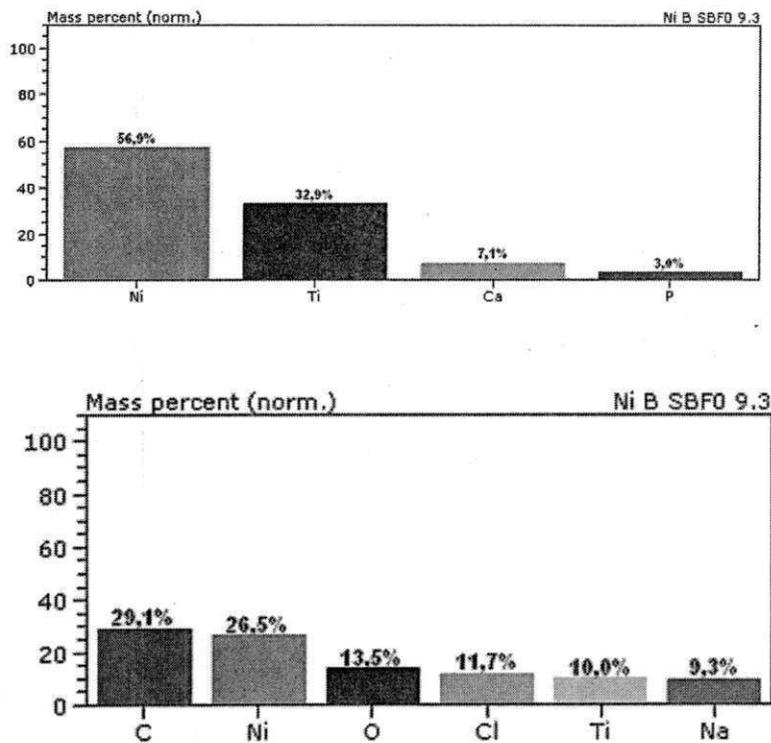


Figura 59: Liga rica em níquel modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

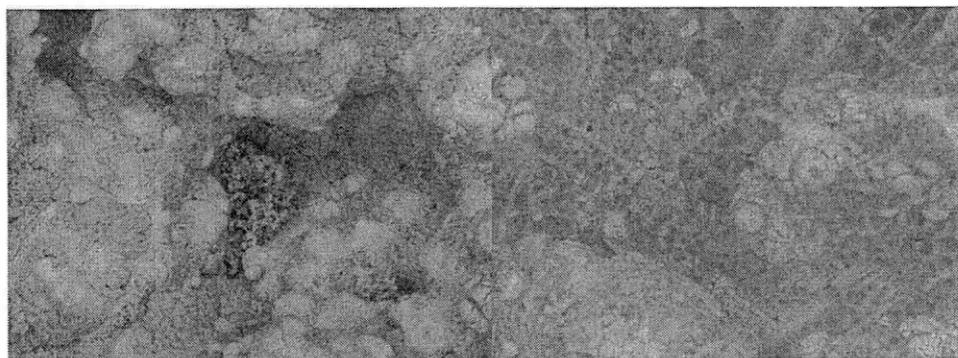


Figura 60: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em níquel modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.

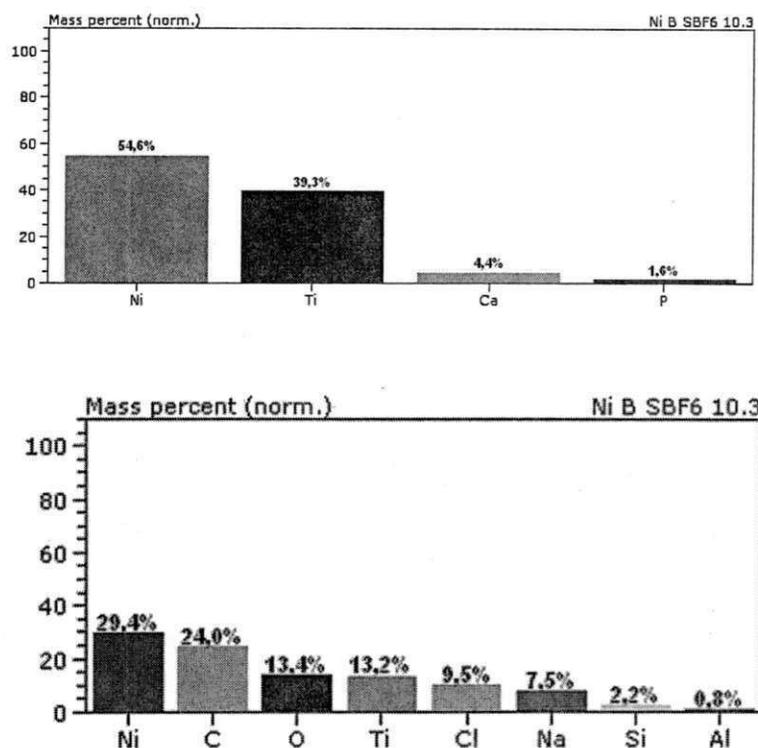


Figura 61: Liga rica em titânio modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

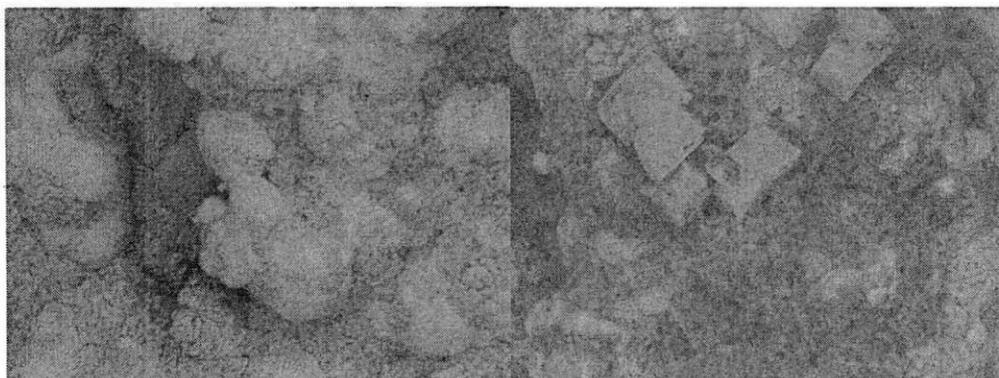


Figura 62: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em titânio modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-0 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.

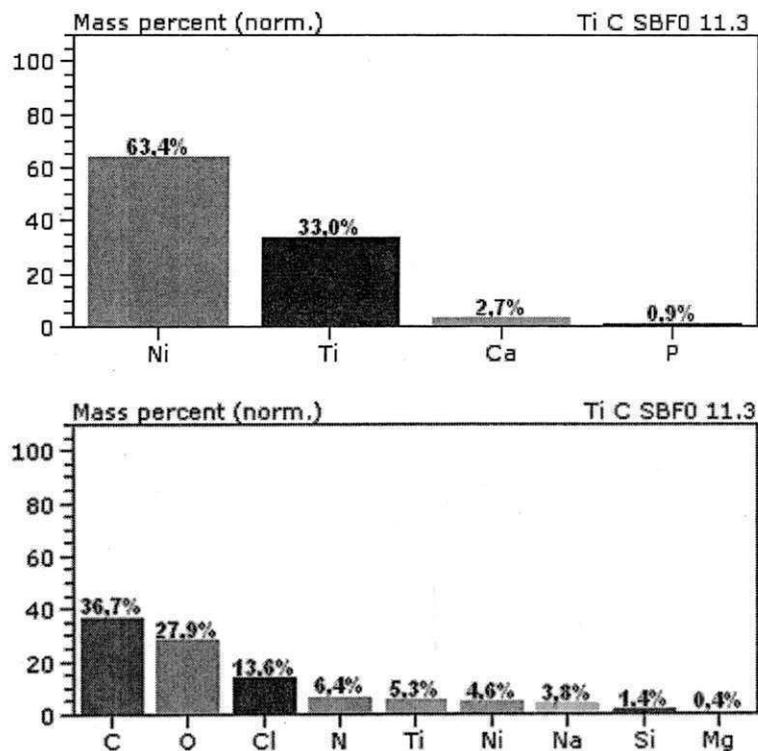


Figura 63: Liga rica em titânio modificada por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisada em MEV com aumento de 2000x antes (esquerda) e após (direita) a imersão em SBF-0.

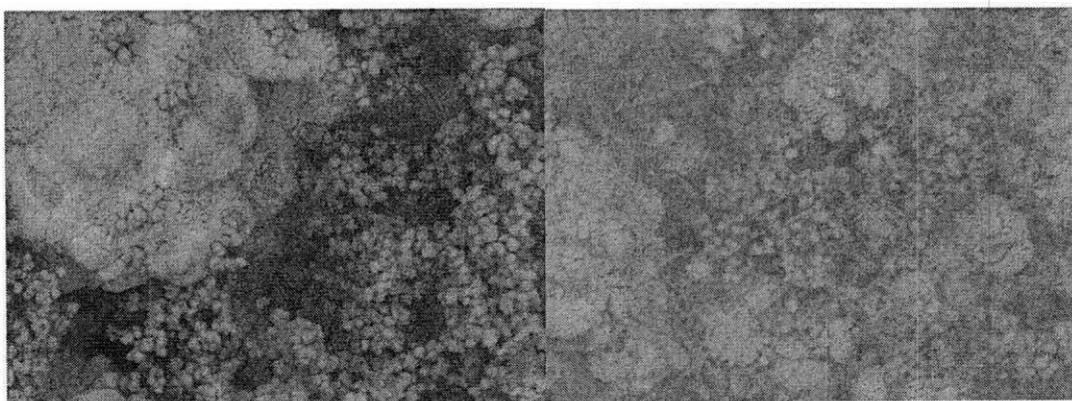
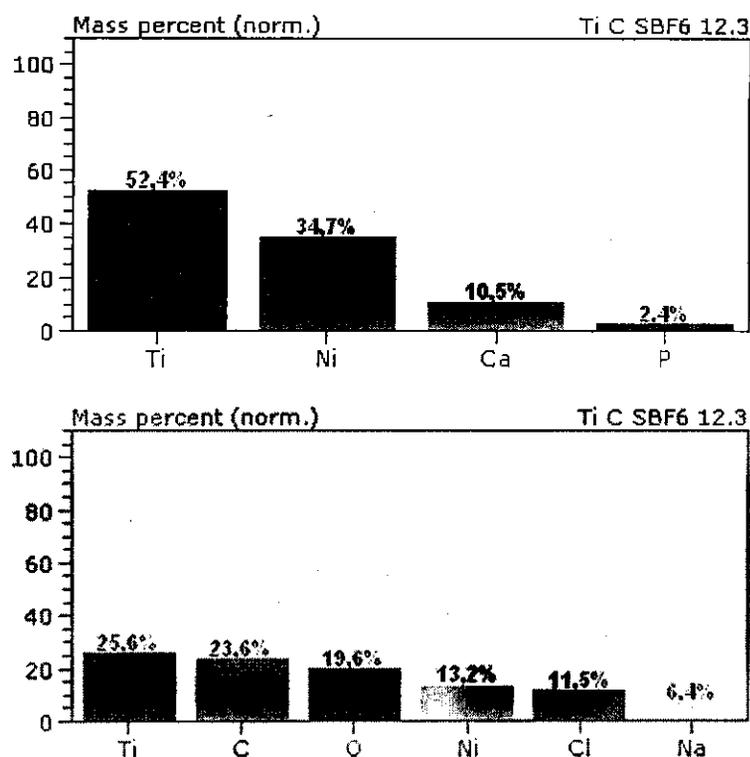


Figura 64: Elementos químicos presentes nas amostras ricas em titânio modificadas por laser e com deposição de apatitas por SBF-6 analisadas antes (acima) e após (abaixo) a imersão em SBF tipo 0 para o ensaio de bioatividade.



Analisando-se as imagens obtidas pelo MEV, pode-se perceber que as amostras modificadas superficialmente por laser e deposição de apatitas por SBF tipo 6 apresentaram quantidade significativamente maior de apatitas em sua superfície do que as amostras cuja deposição foi a partir de SBF-0. Esse resultado reitera o estudo de Aparecida (2006) quanto à indicação de SBF-6 para fins de deposição superficial, visto que as diferenças entre as deposições proporcionadas – SBF tipo 0 e tipo 6 – foram consideráveis.

O ensaio de EDX, no primeiro momento, foi induzido a verificar a ocorrência de Fósforo (P) e Cálcio (Ca), na tentativa de identificar o tipo de fosfato de cálcio presente na superfície da amostra através do cálculo da Relação Ca/P. As amostras apresentaram-se com uma razão molar de aproximadamente 1,0, representando um valor médio da relação Ca/P. Sendo assim, pode-se afirmar que, possivelmente, estejam presentes outros fosfatos de cálcio além da hidroxiapatita. No segundo momento, após a imersão em SBF para o ensaio da bioatividade, foram encontrados os elementos C, Ti, Ni, Cl, Na, P, Ca, O, Si e Mg (magnésio). Nesse segundo ensaio

não houve interferência para identificação de um elemento químico em especial, já que a intenção era a identificação de todos os componentes presentes na superfície.

A interação dos elementos C (carbono) e O (oxigênio), presentes na amostra, podem resultar na formação de carbeto de titânio (TiC) e óxido de titânio (TiO₂). A camada passiva de óxido de titânio forma-se rapidamente quando o metal entra em contato com oxigênio, sendo um dos óxidos conhecidos mais estáveis.

5.4.3 Difração de Raios-X (DRX)

Um dos testes utilizados para o ensaio de bioatividade foi a difração de raios-X. Nas figuras 65, 66 e 67, 68, 69 e 70 pode-se visualizar os difratogramas das três composições polidas e também das que foram modificadas superficialmente por laser Ytterbium pulsado.

Figura 65: Difratograma de raios-X para a liga equiatômica polida antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

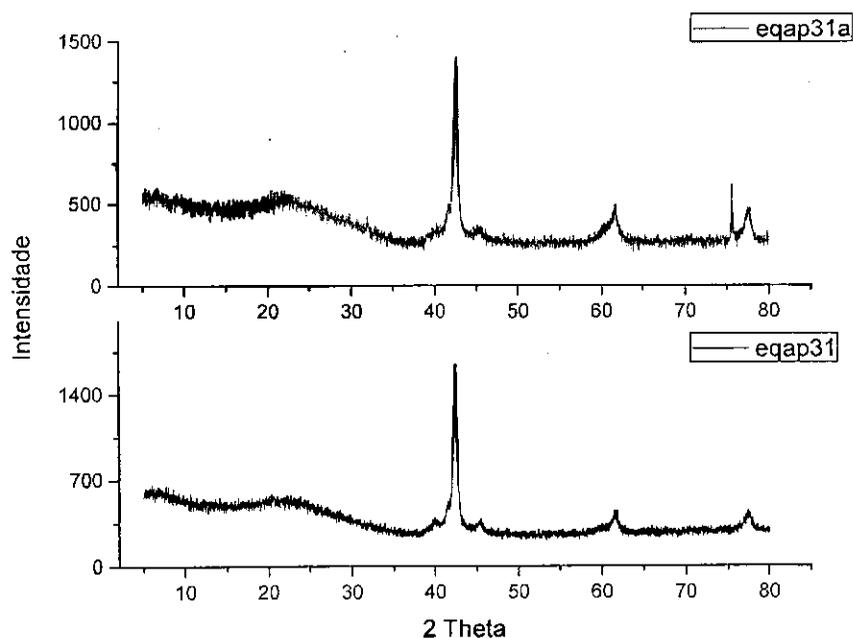


Figura 66: Difratoograma de raios-X para a liga rica em níquel polida antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

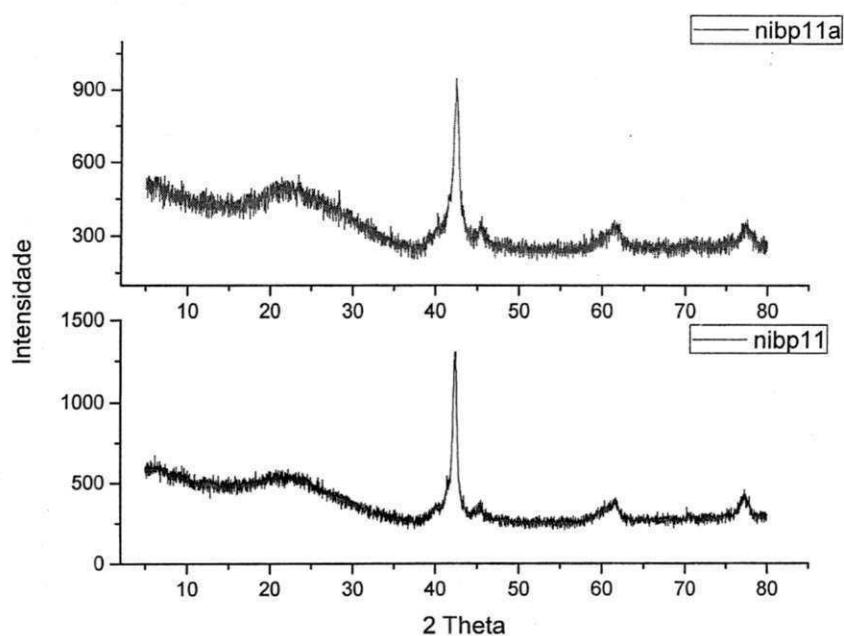
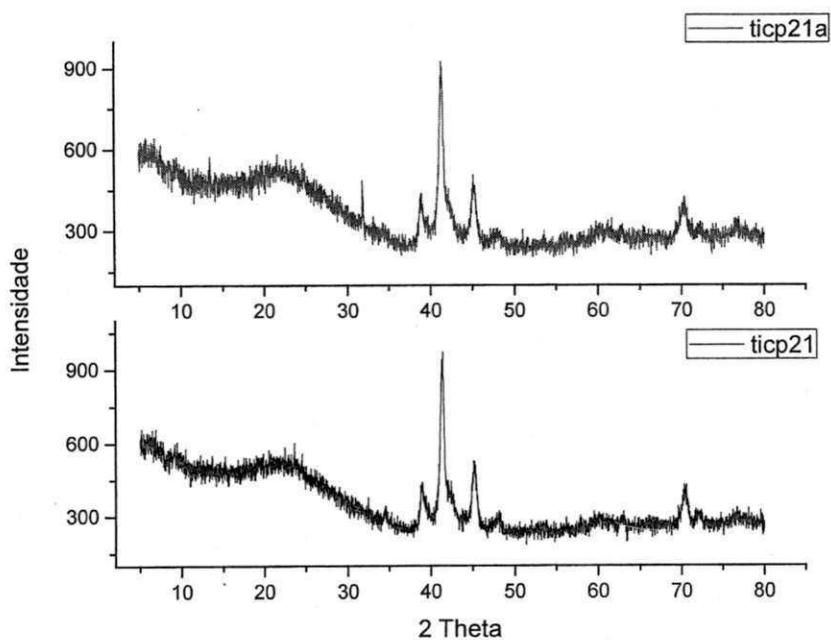


Figura 67: Difratoograma de raios-X para a liga rica em titânio polida antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.



Observando-se os difratogramas para as três composições polidas e das três que foram modificadas superficialmente por laser Ytterbium pulsado pode-se perceber que não houve diferença significativa entre as composições quando comparados os resultados antes e após a imersão em SBF para o ensaio de bioatividade. Os picos podem ser localizados em torno de $22,50^\circ$, $43,14^\circ$, $62,58^\circ$ e $77,56^\circ$, sendo o primeiro característico da fase martensítica, enquanto que os demais picos são indicativos de estrutura cristalina cúbica de corpo centrado, característica da fase austenítica da liga.

No caso da liga rica em titânio polida e da variação com laser, além dos picos característicos das fases da liga de Nitinol, há picos também em $45,54^\circ$, $39,34^\circ$ e $70,80^\circ$, referentes à possível presença de óxidos de titânio (TiO_2), sendo explicado pelo fato de as ligas de titânio serem recobertas pelo óxido quando expostas ao ar. Esta liga demonstrou maior intensidade nesses picos em virtude de haver maior concentração de titânio.

Figura 68: Difratograma de raios-X para a liga equiatômica com aplicação superficial de laser antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

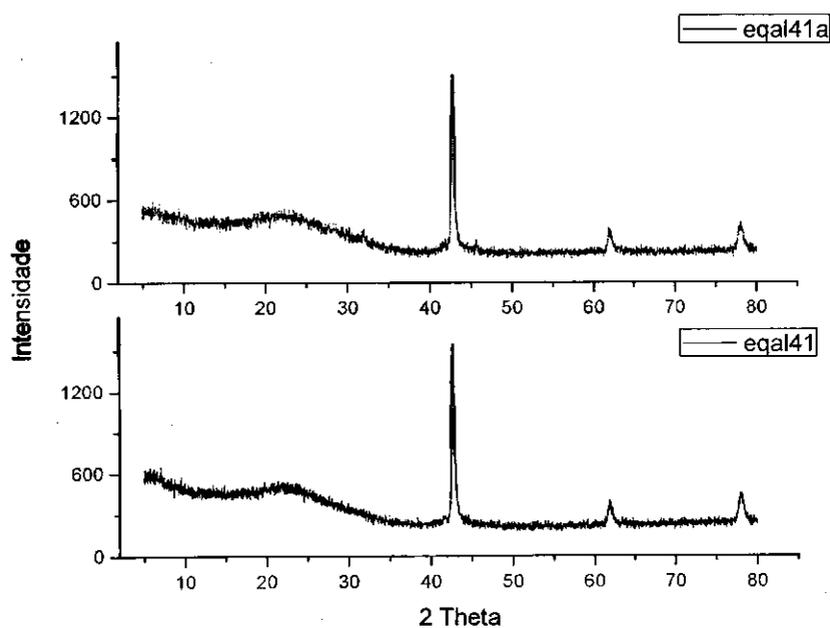


Figura 69: Difratoograma de raios-X para a liga rica em níquel com aplicação superficial de laser antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

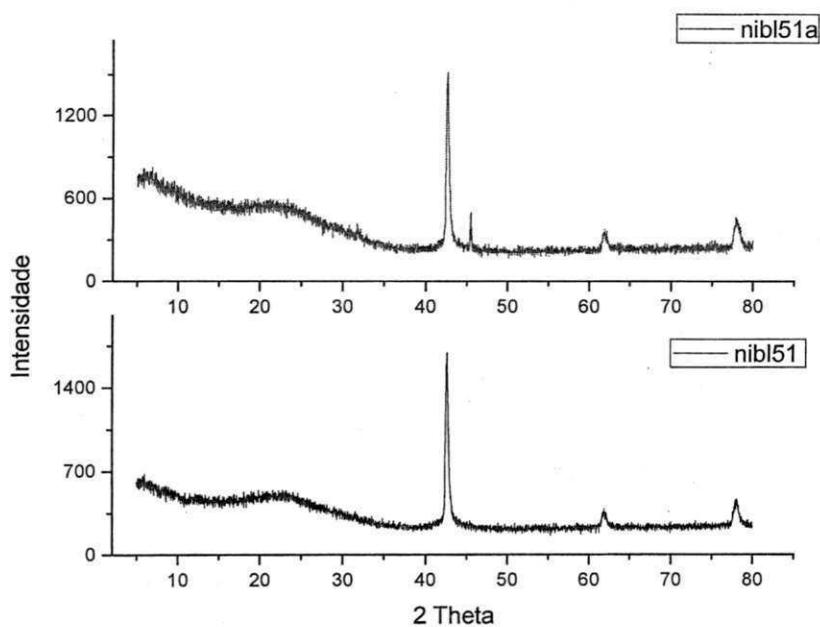
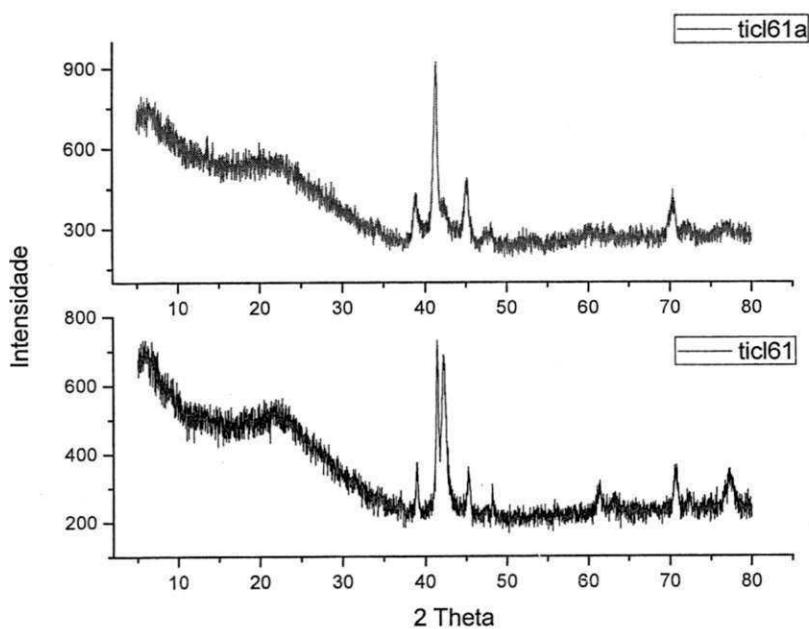


Figura 70: Difratoograma de raios-X para a liga rica em titânio com aplicação superficial de laser antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.



Pode-se perceber, de acordo com as figuras 68, 69 e 70, um ligeiro decréscimo na cristalinidade das ligas modificadas à laser em comparação com as polidas, justificado pelo processo de rápida fusão e solidificação proporcionada pelo laser, formando-se, assim, óxidos não-estequiométricos e gerando um estado de instabilidade.

As análises referentes às amostras com deposição superficial de apatitas podem ser observadas nas figuras 71, 72, 73, 74, 75 e 76. Os difratogramas revelam um decréscimo de cristalinidade em relação às amostras polidas, embora tenha sido realizado tratamento térmico a 800°C por 1 hora previamente ao ensaio de bioatividade. O decréscimo de cristalinidade pode ser observado principalmente nos picos relacionados à formação dos óxidos, que pode estar atribuída à deposição de apatita amorfa em sua superfície.

Figura 71: Difratograma de raios-X para a liga equiatômica com deposição de apatitas por SBF-6 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

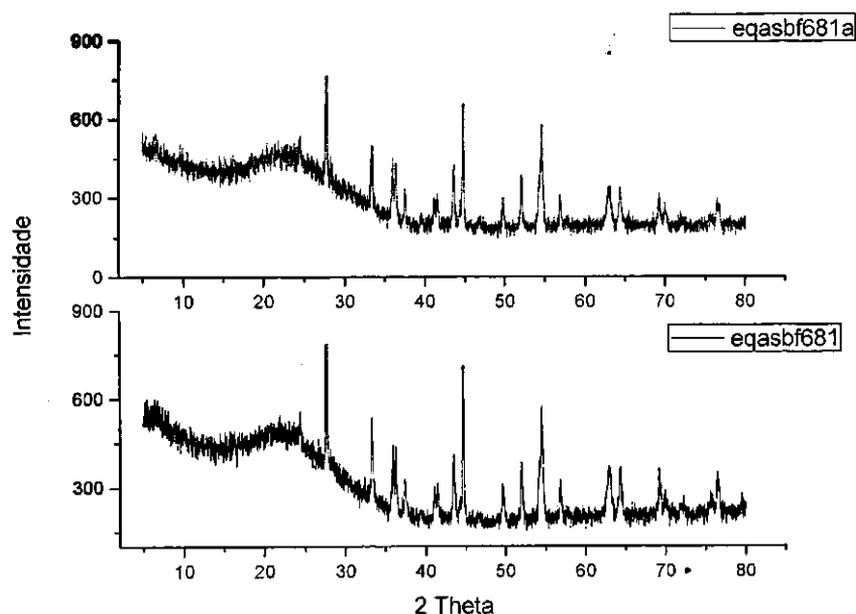


Figura 72: Difratoograma de raios-X para a liga equiatômica com deposição de apatitas por SBF-0 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

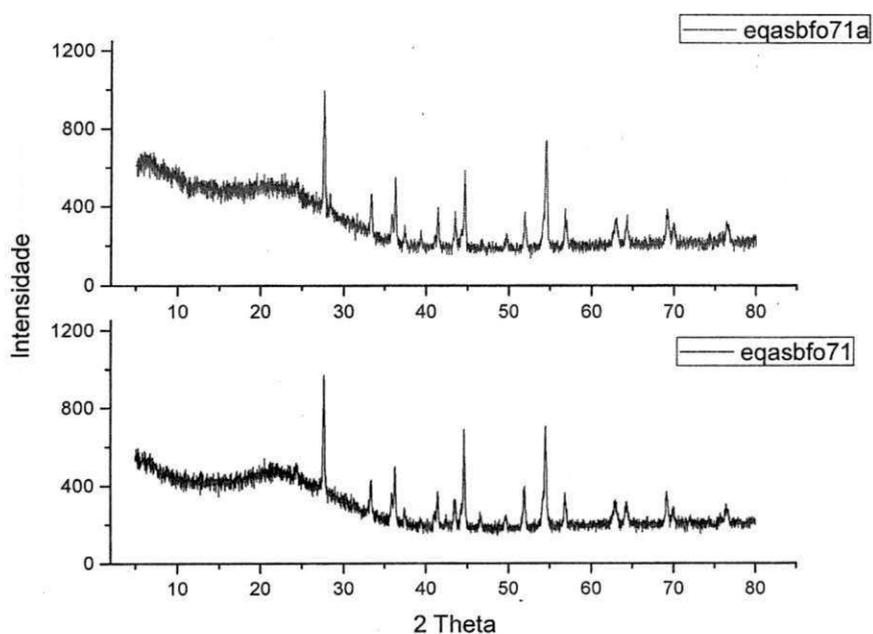


Figura 73: Difratoograma de raios-X para a liga rica em níquel com deposição de apatitas por SBF-6 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

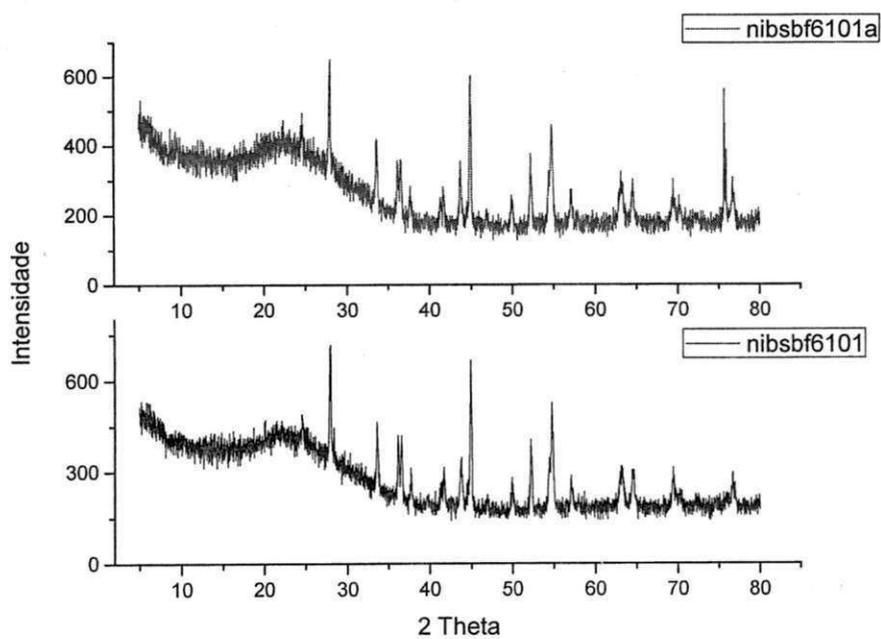


Figura 74: Difratoograma de raios-X para a liga rica em níquel com deposição de apatitas por SBF-0 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

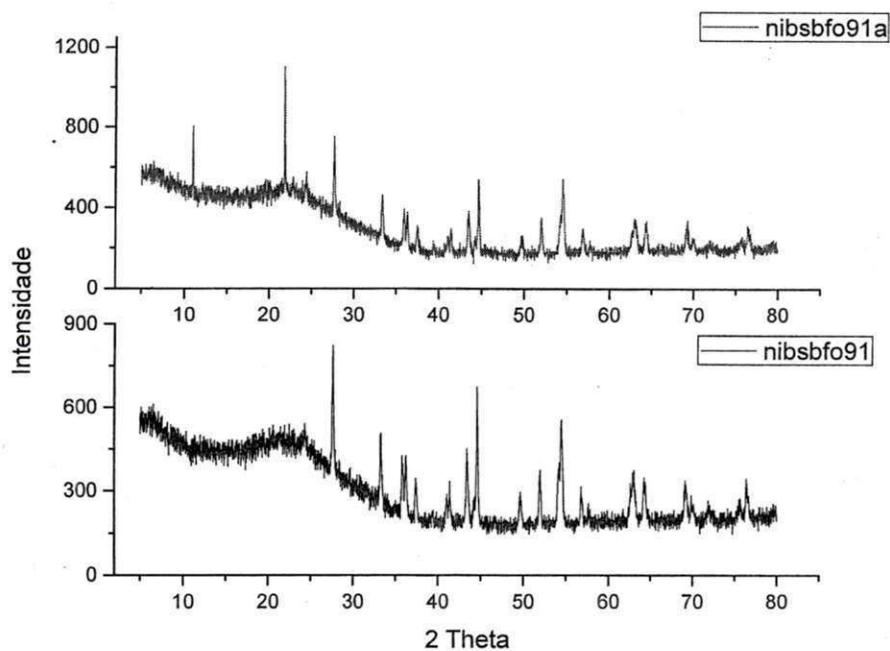


Figura 75: Difratoograma de raios-X para a liga rica em titânio com deposição de apatitas por SBF-6 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.

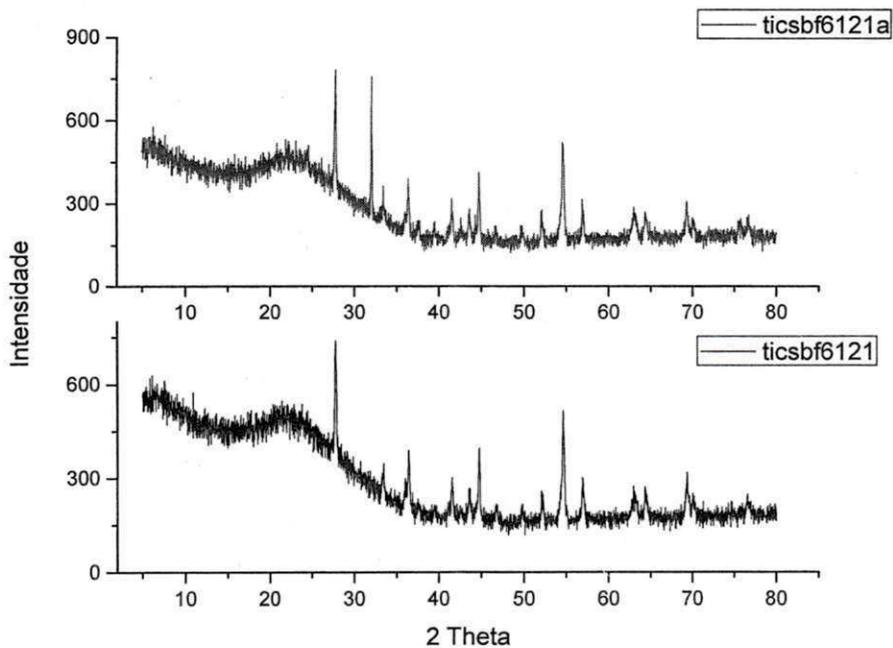
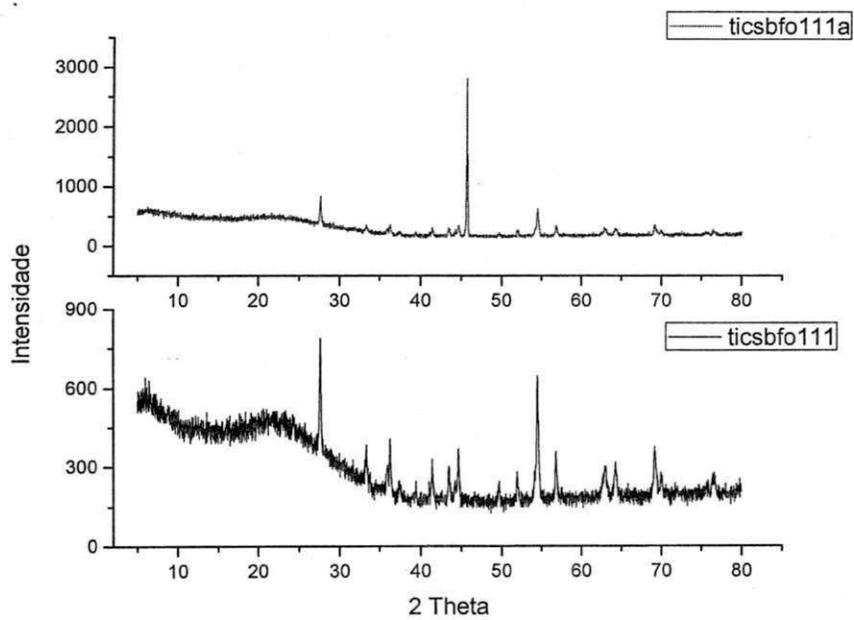


Figura 76: Difratoograma de raios-X para a liga rica em titânio com deposição de apatitas por SBF-0 antes (preto) e após (vermelho) a imersão em SBF 0 para o ensaio de bioatividade.



6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir a partir dos subsídios científicos e experimentos realizados que:

- ✓ A aplicação superficial do Laser Ytterbium pulsado nas amostras tornou possível a utilização das três composições que, em estado bruto (apenas polidas), foram inviáveis ao uso em seres vivos, apresentando viabilidade celular inferior a 50%.
- ✓ As modificações superficiais promoveram melhores propriedades biológicas e físico-químicas, tornando as ligas de Nitinol mais adequadas para a utilização como biomaterial.
- ✓ As ligas de Nitinol com aplicação de laser e deposição de apatitas em sua superfície apresentaram molhabilidade adequada para sua aplicação, enquanto que as ligas unicamente irradiadas a laser demonstraram hidrofóbicas em sua maioria.
- ✓ As ligas com modificações superficiais apresentaram-se mais adequadas à osseointegração, em virtude de possuírem maior rugosidade e área de contato, além da presença de apatitas, que podem promover mais rápida adesão do biomaterial ao tecido ósseo.
- ✓ O ensaio de bioatividade demonstrou propriedades mais satisfatórias das ligas modificadas superficialmente para utilização como biomaterial.
- ✓ Entre as composições e tratamentos superficiais analisados, a liga rica em titânio modificada à laser e com deposição de apatitas por SBF-6 foi a que melhor atendeu às expectativas para utilização como biomaterial para implante odontológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBREKTSSON T, BRÅNEMARK P-I, HANSSON H, LINDSTRÖM J.

Osseointegrated titanium implants: Requirements for insuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta OrthoScand* 1981; 52: 155-170.

ALENCAR, A. C. Estudo das modificações na superfície do Ti cp e da liga Ti-6Al-4V usados como biomateriais utilizando-se deposição por plasma-spray. 2002. 73p.

Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

ALMEIDA FILHO, E. Avaliação do Tratamento Térmico em Recobrimentos Cerâmicos Bioativos pelo Método Biomimético sobre Titânio c.p. modificados pelo Laser Nd:YAG. 2008. 100p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

ANDRADE MC, FILGUEIRAS MRT, OGASAWARA T. Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface. *J EurCerSoc* 2002; 22: 505-510.

APARECIDA, A. H.; Recobrimento de Apatitas empregando-se o Método Biomimético: Estudo da Influência dos Íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e HCO_3^- na Formação de Hidroxiapatita. 2006. 115p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

ARAÚJO, C. J. Fabrication of Shape Memory alloys using the plasma Skull push-pull process. *Journal of Materials Processing Technology*. v.7, p.3657-3664, 2009.

BASU, B.; NATH, S. Fundamentals of Biomaterials and Biocompatibility. In: BASU, B.; KATTI, D. S.; KUMAR, A. *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009, p.3-18.

BIOMATERIALES DE NATURALEZA INORGÁNICA: Metales, Aleaciones Y Cerámicas. 2012.

BOSCHI, A. O. O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? In: CONGRESSO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE METALURGIA, 50, 1995, São Pedro. Anais. São Paulo: ABM, 1996. v. 6, p. 43–53.

BRANEMARK, P. I.; ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. Prótesistejido – integradas: La oseointegración en la odontología clínica. Berlin: QuintessenzVerlags-GmbH, 1987. 350 p.

BRANEMARK, P. I.; CARLSSON, L.; RÖSTLUND, T.; ALBREKTSSON, B.; ALBREKTSSON, T.; Osseointegration of Titanium Implants. *Acta Orthop Scand*, v.57, p.285-9, 1986.

BRUNSKI JB. Biomaterials and biomechanics in dental implant design. *Int. J. Maxillofac. Implants.*, v.3,n.2, p.85-97, 1988.

BUGARIN JÚNIOR, J. G.; GARRAFA, V. Bioética e Biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. *Revista Saúde Pública*, 2007. n. 41, v.2, p. 223-8.

CAO, W.; HENCH, L. Bioactivematerials. *Ceramics International*, v. 22, n. 6, p. 493-507, 1996.

CATÃO, C. D. S. Avaliação de Ligas de Nitinol Nacionais: Perspectiva para Aplicação em Implantes Dentários. 2010. 42p. Qualificação (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

CAULIER H, VAN DER WAERDEN JPCM, WOLKE JGC, KALK W, NAERT I, JANSEN JA. A histological and histomorphometrical evaluation of the application of screw-designed calciumphosphate (Ca-P)-coated implants in the cancellous maxillary bone of the goat. *J Biomed Mater Res* 1997; 35(1): 19-30.

COUTINHO, M.P. Influência da morfologia da superfície na molhabilidade do titânio comercialmente puro. 2007. 84p. (Dissertação de Mestrado). Instituto Militar de Engenharia.

CRAIG, R. G.; POWERS, J. M.; WATAHA, J. C. Materiais Dentários: Propriedades e Manipulação. 7 ed. São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda.; 327p. 2002.

DE CARVALHO, B. M.; PELLIZZER, E. P.; DE MORAES, S. L. D.; FALCÓN-ANTENUCCI R.; FERREIRA JÚNIOR, J. S. Tratamentos de Superfície nos Implantes Dentários, Ver. Cir. Traumatol. Buço Maxilofac., Camaragibe, v.9, n.1, p.123-130, 2009.

DE GROOT K. Calcium fosfate coatings: alternativesto plasma spray. Bioceramics 1998; 11: 41-43.

DINATO, J. C.; POLIDO, W. D. Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese, 1ed, São Paulo, Artes Médicas, 2001.

DOLL, B. A.; KUKREJA, A.; SEYEDAIN, A.; BRAUN, T. Dental Implants. IN: GUELCHER, S. A.; HOLLINGER, J. O. An Introduction to Biomaterials. Taylor & Francis: New York. p. 395-416. 2009.

EISENBARTH, E.; MEYLE, J.; NACHTIGALL, W.; BREME, J. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. Biomaterials, v.17, n.14, p.1399-1403, 1996.

FIGUEIREDO, A. M. G. Caracterização da fadiga mecânica de baixo ciclo em ligas superelásticas de NiTi. 2006. 235p. (Tese de Doutorado). Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais.

FOOK, M. V. L. Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita na superfície de polietileno de ultra-peso molecular para aplicação como biomaterial.

2005. 128p. (Tese de Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara.

FRANCISCHONE CE, VASCONCELOS LW. Osseointegração e as prótese unitárias. São Paulo: ArtesMédicas: EAP-APCD, 1998.

FREIHERR, G. Shape memory alloys offer untapped potential. Medical Device & Diagnostic Industry Magazine. 1998. Disponível em: <www.devicelink.com>

GEETHA, M.; SINGH, A. K.; ASOKAMANI, R.; GOGIA, A. K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. Progress in materials science, v.54, p. 397-425, 2009.

GELAIN, F.; DEMETRIO, V. B.; PARUCKER, M. L.; KLEIN, A. N. Desenvolvimento de Ligas Sinterizadas de Níquel. XXI Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica de Engenharia. Universidade Regional Unijuí. 2006.

GIAVARESI G, FINI M, CIGADA A, CHIESA R, RONDELLI G, RIMONDINI L et al. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. J Biomed Mater Res 2003a; 67(1): 112-20.

GODLEY, R.; STAROSVETSKY, D.; GOTMAN, I. Bonelike apatite formation niobium metal treated in aqueous NaOH. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v.15, n.10, p. 1073-1077, 2004.

GUELCHER, S. A.; HOLLINGER, J. O. An Introduction to Biomaterials. New York: Taylor & Francis Group, 2006, p. 1-13.

GYÖRGY, E.; PÉREZ DEL PINO, A.; SERRA, P.; MORENZA, J. L. Chemical Composition of Dome-shaped Structures Grown on Titanium by Multi-pulse Nd: YAG LASER Irradiation. Appl. Surface Sci., v.1, n.8, 2003.

HALLAB, A.P.; SHORT, R.D.; JOHNS, R.; SCHWACH, G. The surface analysis of implant materials..The surface composition of a titanium dental implant material.Clin. Oral Implants Res., v.4, n.3, p.144-150, 2001.

HANAHA, T. Titanium and its oxide film a substrate for formation of apatite. In: DAVIES, J. E. The bone-biomaterial interface. Toronto: University of Toronto Press, 1991. cap. 2, p. 49-61.

HENCH, L. L.; WILSON, J.An introduction to bioceramics. London: World Scientific, 1993. v.1, 386 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARD. ISO 10993: biological evaluation of medical devices. Disponível em:

<<http://www.iso.org/iso/en/ISOOnline.frontpage>>. Acesso em: 28 maio 2012.

JEFFCOAT MK, MCGLUMPHY EA, REDDY MS, GEURS NC, PROSKIN HM. A comparison of hydroxyapatite (HA) – coated threaded, HA-coated cylindrical, and titanium threaded endosseous dental implants. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18: 406-410

KASEMO B., LAUSMAA J. Biomaterials from surface science perspective. In: RATNER B.D. Surface characterization of biomaterials. Proceedings of the Symposium on surface Analysis of Biomaterials, Ann Arbor, 1987.Amsterdam, Elsevier, Science Publishers, n.1, p.1-12, 1988.

KIM Y-H, KOAK JY, CHANG IT, WENNERBERG A, HEO S-J.A histomorphometric analysis of the effects of various surface treatment methods on osseointegration.Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18(3): 349-356.

KLOKKEVOLD, P. R.; NISHIMURA, R. D.; ADACHI, M.; CAPUTO, A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface: a torque removal study in the rabbit. Clinical Oral Implants Research, v.8, n.6, p.442-447, 1997.

KOKUBO T, MIYAI F, KIM HM. Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals. *J Amer Ceram Soc* 1996; 79(4): 1127-1129.

KOTENKO M. V., KOPYSSOVA V. A., RAZDORSKY V. V., KISHKAREV V. V. Shape Memory Dental Quadriradical Implants for Single-Stage Immediate Implantation and Undelayed Dental Prosthetics. *Biomedical Engineering*.v.42, n.3, p.156-158, 2008.

KRONE, L.; MENTZ, J.; BRAM, M.; BUCHKREMER, H. P.; STOVER, D. The potential of powder metallurgy for the fabrication of biomaterials on the basis of Nickel-Titanium: A case study with a staple showing shape memory behaviour. 7 ed. *Advanced Engineering Materials*, p.613-619, 2005.

LACEFIELD WR. Materials characteristics of uncoated/ceramic-coated implant materials. *Adv Dent Res* 1999; 13: 21-26.

LAGOUDAS, D.; REDINIOTIS, O.; KHAN, M. Applications of shape memory alloys to Bioengineering and Biomedical Technology. IN: 4th International Workshop on Scattering Theory and Biomedical Applications. p. 195-207, 1999

LAVISSE L., GREVEY, D., LANGLADE, C., VANNES, B.; The Early Stage of the LASER-induced Oxidation of Titanium Substrates. *Appl. Surface Sci.*, v.186, p.150-155, 2002.

LIMA, L. H. M. A. Estudo da Influência do Plasma de Ar e H₂ nas propriedades de Materiais Cerâmicos para Aplicação Odontológica. 2011. 163p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

LINKOW, L.I. Implant Dentistry - yesterday, today and tomorrow. Proceedings of the 15th Annual International Symposium of the American Academy of Implant Prosthodontics, Atlanta, 1996.

LIU, F. et al. Biomimetic deposition of apatite coatings on micro-arc oxidation treated biomedical NiTi alloy. *Surface & Coating Technology*. v. 204. p. 3294-3299, 2010.

LU, X. L., CAI, W., ZHAO, L. C., Damping behavior of a Ti₄₄Ni₄₇Nb₉ shape memory alloy. *Journal of Materials Science Letters*, v.22, p. 1243-1245, 2003.

MERTMANN, M. NiTi: the material for implants and instruments. *Memory-Metalle*, Weil am Rhein, Germany, 2000, Technology & Services, Disponível em: www.memorymetalle.com.de

MISCH C.E. *Prótese sobre Implantes*. São Paulo: Editora Santos, 2006.

MIYAZAKI, S; SACHDEVA, R. L. Shape memory effect and superelasticity in Ti-Ni alloys. In: YONEYAMA, T; MIYAZAKI, S. *Shape memory alloys for biomedical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2009. P. 3-19.

MOTTA, C. P. T. *Efeitos de Transformação de Fase Induzida por Tensionamento sobre a Resistência à Corrosão nas Ligas de Níquel-Titânio em Solução de Hipoclorito de Sódio*. 2008. 123p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

OHGUSHI H, OKUMURA M, YOSHIKAWA T, et al.: Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J. Biomed. Mat. Res.*, v.26, p.885-895, 1992.

ONG JL, CARNES DL, BESSHO K. Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials* 2004; 25(19): 4601-6.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006. 538p.

OTSUKA, K., REN, X., *Physical metallurgy of Ti-Ni-based shape memory alloys*, *Progress in Materials Science.*, v. 50, p.511-678, 2005.

OTSUKA, K. WAYMAN, C.M. Shape Memory Materials Cambridge University Press: Cambridge, England, 1998.

PHILLIPS, A. K. J.: Materiais Dentários. 11 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Brasil; 2005. 800p.

PONCIANO, R. C. O. Estudo da Toxicidade de Ligas de Ni-Ti: uma Contribuição para o Uso de Ligas Nacionais e a Ortodontia. 2010. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

PRETORIOUS JA, MELSEN B, NEL JC, GERMISHUYS PJ. A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants. Int J Oral Maxillofac Implants 2005; 20: 387-398.

PUCCI, L.; PÉRTILE. L. B.; SILVA, P. R. C.; PEREIRA, R. B. Biocerâmica: Características e Aplicações. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia de Materiais, 2002.

RYHÄNEN, J.; NIEMI, E.; SERLO, W. Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behaviour in human cell cultures. J. BioMed Mater Res. 35:451-7, 1997.

RUSO, E. M. A.; YOUSSEF, M. N.; VIEIRA, G. F.; TURBINO, M. L.; ODA, M.; CARVALHO, R. C. R. Materiais para Restaurações Diretas. IN: RUSSO, E. M. A.; YOUSSEF, M. N.; VIEIRA, G. F.; TURBINO, M. L.; ODA, M.; CARVALHO, R. C. R. Dentística – Restaurações Diretas. São Paulo: Santos, 2010.

SENA LA, ANDRADE MC, ROSSI AM, SOARES GA. Hydroxyapatite deposition by electrophoresis on titanium sheets with different surface treatment. J Biomed Mater Res. 2002; 60: 1-7.

SCHROEDER, A. Precondições para o Sucesso dos Implantes a Longo Prazo. IN: SCHROEDER, A.; SUTTER, F.; KREKELER, G.; BUSER, D.; MAEGLIN, B.; STEINEMANN, S.; STICH, H.; van der ZYPEN, E. Implantologia Dental - Fundamentos Gerais do Sistema ITI. Alemanha, 1994. p.2-10.

SILVA, M. H. P. Apostila de Biomateriais. Disponível em:

<<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAojYAC/apostila-biomateriais>> Acesso em 03 jun 2012.

SILVA, N. J. Estudo do comportamento termodinâmico de uma liga NiTi com memória de forma usando análise dinâmico-mecânica (DMA). (Dissertação de Mestrado). 2009.113p. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

SOARES, G. A. S., Biomateriais: classificação, seleção e avaliação, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2002.

SPECK, K.; FRANKER, A. Anodic Polarization Behavior of NiTi and Ti-6Al-4V in simulated physiological solutions. J Dent Res, v.59, p-1590, 1980.

STEINEMANN, S. As propriedades do Titânio. IN: SCHROEDER, A.; SUTTER, F.; KREKELER, G.; BUSER, D.; MAEGLIN, B.; STEINEMANN, S.; STICH, H.; van der ZYPEN, E. Implantologia Dental – Fundamentos Gerais do Sistema ITI. Alemanha, 1994.p.37-58

STRNAD Z, STRNAD J, POVYSIL C, URBAN K. Effect of plasma-sprayed hydroxyapatite coating on the osteoconductivity of commercially pure titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 2000; 15: 483-490.

SYKARAS N, IACOPINO AM, MARKER VA, TRIPLETT RG, WOODY RD. Implant materials, designs and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. Int J Oral Maxillofac Implants 2000; 15: 675-690.

VANDEURZEN, U., VERELST, H., SNOEYS, R., DELAEY, L., Dynamic properties of high damping metals. Journal de Physique., v..10, p. 1169-1174, 1981.

VALLET, R. M. Introduction to the world of biomaterials. *Anales de Quimica International Edition*, v. 93, p. S16-S14, 1997.

VASCONCELOS, L. Avaliação Clínica de Implantes com Diferentes Superfícies, Instalados em Maxilas Reconstruídas com Enxerto Ósseo. *Implant News.*, v.1, n.1, p.27-32, 2004.

WAYMAN, C. M.; DUERIG, T. W. An introduction to martensite and shape memory alloy. IN: DUERIG, T. W.; MELTON, K. N.; STÖCKEL, D.; WAYMAN, C. M. *Engineering aspects of shape memory alloys*. Butterworth-Heinemann, p.3-20, 1990.

WEINBERG, J. B.; MISUKONIS, M. A.; SHAMI, P. J.; MASON, D. L.; SAUIS, W. A.; DITTMAN, E. R.; WOOD, G. K.; SMITH, D.; McDONALD, K. E.; BACHUS, A. F.; GRANGER, D. L. Human Mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase. *Blood*, v.86, n.3, p.1184-1195, 1995.

WENNERBERG A, ALBREKTSSON T, ANDERSSON B, KROLL JJ. A histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 1995; 6: 24 –30.

WILLIAMS, D. F. *Concise encyclopedia of medical and dental materials*. Oxford: Pergamon Press, 1992.

WORTHINGTON, P.; LANG, B.R.; LA VELLE, W.E. *Osseointegração na Odontologia*. Quintessence Publish. Co. Inc., Chicago, 1996.

YAHIA, L. H. *Shape Memory Implants*. New York: Springer. 2000.

ZECHNER W, TANGL S, FÜRST G, TEPPER G, THAMS U, MAILATH G et al. Osseous healing characteristics of three different implant types. A histologic and histomorphometric study in mini-pigs. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14: 150-57.

ZHOU, J. G.; KOULAS, S.; CHONG, P. L. G. Shape memory alloy activated high pressure optical cell for biophysical studies. *Scientific Instruments*.v.71, n.11, p.4249-56, 2000.